

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL**

**ETUDE DE LA RÉGULATION DE L'ACIDE GRAS SYNTHASE PAR  
L'INSULINE, LA TRIODOTHYRONINE ET LES ACIDES GRAS A  
CHAINES MOYENNES**

**MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE**

**PAR  
MURIELLE MELEM AKPA**

**MARS 2009**

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## **REMERCIEMENTS**

Le mémoire suivant représente le travail des deux dernières années, qui fut possible grâce au soutien de tous.

C'est pourquoi, je voudrais tout d'abord remercier le Dr. Catherine Mounier, ma directrice de recherche, de m'avoir prise au sein de son laboratoire, de ses conseils et de son encadrement qui m'ont été très précieux. Je la remercie également de m'avoir donné une idée de la vie dans le monde de la recherche.

Je remercie sincèrement les membres de mes comités pour toutes leurs suggestions et recommandations lors de la rédaction.

Je remercie les membres de mon laboratoire pour leur aide qui m'a été très précieuse.

Je voudrais également remercier mes collègues de BioMed pour le soutien dont j'ai bénéficié au cours de ces deux dernières années.

Finalement, je voudrais remercier ma famille pour tout leur support et leurs encouragements.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	vi
LISTE DES TABLEAUX .....	vii
ABBRÉVIATIONS.....	viii
RÉSUMÉ.....	x
INTRODUCTION.....	1
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	4
I.    MÉTABOLISME DES ACIDES GRAS.....	5
a.  La synthèse hépatique des acides gras.....	5
i.  Initiation de la synthèse des acides gras.....	5
ii. Protéine FAS.....	8
iii. Réaction catalysées par FAS.....	11
b.  La transformation des acides gras.....	12
i.  Désaturation.....	12
ii. Estérification.....	13
iii. Devenir des acides gras ou la $\beta$ -oxydation .....	14
iv. Métabolisme particulier des MCFA .....	16
c.  Transport des acides gras et captation.....	18
II.   RÉGULATION DE LA FAS.....	20
a.  Le gène <i>FAS</i> .....	20
b.  La régulation hormonale.....	21
i.  Régulation de la FAS par l'insuline.....	21
ii. Régulation de la FAS par la $T_3$ .....	23

c. La régulation nutritionnelle.....	25
i. Régulation de la FAS par les glucides.....	25
ii. Régulation de la FAS par les acides gras polyinsaturés.....	25
iii. Régulation de la FAS par les acides gras à chaîne moyenne.....	26
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>28</b>
 I. RÔLE DE L'HEXANOATE DANS L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ DE LA FAS.....	29
1. Article : Inhibition of insulin/T <sub>3</sub> -induced fatty acid synthase activity by acyl-CoA hexanoate .....	29
a. Abstract .....	30
b. Introduction .....	31
c. Material and Methods .....	32
i. Materials .....	32
ii. Cell culture .....	32
iii. FAS activity .....	32
iv. Fatty acid uptake .....	32
v. Lipid profile .....	33
d. Results .....	34
i. Role of insulin, T <sub>3</sub> and MCFA on FAS enzymatic activity .....	34
ii. Effect of hormonal treatment of hexanoate uptake .....	34
iii. Pretranslational effect of hexanoate on FAS enzymatic activity .....	34
iv. Effect of MCFAs metabolites on FAS enzymatic activity .....	35
v. Role of the inhibitors of fatty acids metabolism on the effect of hexanoate .....	35
e. Discussion .....	37
f. Acknowledgement .....	38
g. References .....	39
h. Figure legends .....	42

2. Résumé des résultats de l'article.....	48
II. RÔLE DE LA PHOSPHORYLATION DUR LA RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ DE LA FAS.....	49
a. Méthodes .....	49
i. Construction du plasmide.....	49
ii. Analyse de l'activité du promoteur .....	49
III. RÔLE POTENTIEL DES RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES DANS LE TRANSPORT DES ACIDES GRAS.....	53
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>62</b>

## LISTE DES FIGURES

### ÉTAT DES CONNAISSANCES

Figure 1 : Principales étapes de la synthèse des acides gras au niveau hépatique .....	6
Figure 2 : Biosynthèse du malonyl-CoA .....	7
Figure 3 : Localisation des sites fonctionnels du complexe enzymatique de l'acide gras synthase .....	10
Figure 4 : Séquence des réaction pour la synthèse des acides gras <i>de novo</i> par la FAS animale .....	11
Figure 5 : synthèse d'acides gras insaturés .....	13
Figure 6 : Synthèse des triacylglycérols et phospholipides .....	14
Figure 7 : $\beta$ -oxydation des acides gras .....	16
Figure 8 : Métabolisme hépatique des acides gras .....	18
Figure 9 : Voies de signalisation activées par l'insuline et réponses physiologiques .....	22
Figure 10 : Sites de réponse à l'insuline sur le promoteur du gène <i>FAS</i> .....	23
Figure 11 : Mécanisme de régulation transcriptionnelle des gènes par les acides gras polyinsaturés dépendante et indépendante des PPAR .....	26

### RÉSULTATS

Figure 1 : Effect of MCFA on FAS enzymatic activity .....	44
Figure 2: Effect of hormonal treatment on hexanoate uptake .....	45
Figure 3: Effects of the hexanoate metabolites on FAS enzymatic activity .....	46
Figure 4: Effects of lipid metabolic pathways' inhibitors on FAS activity and uptake .....	47
Figure 5: Effects of LY294002 and PD98059 on FAS activity and TRE-mediated transcription in response toe T <sub>3</sub> and insulin treatments .....	50
Figure 6: Représentation schématique de la regulation transcriptionnelle de FAS en réponse à la T <sub>3</sub> et l'insuline.....	52
Figure 7: Implication des récepteurs SR-BI dans le transport des MCFA .....	54

## LISTE DES TABLEAUX

Table 1 : CEH lipid profile when submitted to hormonal stimulations in presence of radio-labeled hexanoic acid .....	48
--	----



## ABBREVIATIONS

ACP: Acyl carrier protein  
ADN: Acide désoxyribonucléique  
ARN: Acide ribonucléique  
ARNm: Acide ribonucléique messenger  
AT : Acétyl transacylase  
ATP: Adénosine triphosphate  
C/EBP: « CAAT enhancer binding protein »  
C<sub>6</sub>: Hexanoate  
C75: inhibiteur de l'acide gras synthase  
CAT: Choramphenicol transférase  
CBP: CREB binding protein  
CE : Cholestérol estérifié  
CEH: Chick embryo hepatocytes  
ChIP: Chromatin immunoprecipitation  
ChREBP: Carbohydrate response element binding protein  
CO<sub>2</sub>: Dioxyde de carbone  
CoA: Co-enzyme A  
CPT: Carnitine palmitoyl transférase  
Da: Dalton  
DGAT: Diacylglycérol acyl-transférase  
DH:  $\beta$ -hydroxyacyl déshydratase  
DIT: diiodotyrosines  
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay  
EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay  
ER: Énoyl réductase  
ERE: Estrogen response element  
ERK : extracellular signal-regulated kinase  
ESI-MS: Electrospray ionisation mass spectrometry  
FAS: Acide gras synthase  
FAT: Fatty Acid Translocase  
GC: Gas chromatography  
GK: Glucokinase  
GPCR: G protein coupled receptor  
GRE: Glucocorticoid response element  
H<sub>2</sub>O: eau  
HDAC: Histone déacylase  
HDL: High density lipoprotein  
IRE: Insulin response element  
KO: Knock-out  
KR:  $\beta$ -cétoacyl réductase  
KS :  $\beta$ -cétoacyl synthase  
LDL: Low density lipoprotein  
MAPK: mitogen-activated protein kinase  
MCFA: Medium chain fatty acid

MEK: MAP/ERK kinase  
MIT: moniodotyrosines  
MT: Malonyl transacylase  
NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide  
NADP: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
NCoR: nuclear receptor corepressor  
NSERC: National Sciences and Engineering Research Council  
OMS/WHO: Organisation mondiale de la santé/ World health organisation  
PL: phospholipide  
PP2A: protéine phosphatase 2A  
PPAR: peroxisome proliferator activated receptor  
PPRE: peroxisome proliferator responsive element  
PUFA: Polyunsaturated fatty acid  
PUFA-BP: Polyunsaturated fatty acid binding protein  
PUFA-RE: Polyunsaturated fatty acid response element  
RT-PCR: Reverse transcriptase polymerase chain reaction  
RXR: Retinoic acid X receptor  
SCD: Stéaryl-CoA désaturase  
SMRT: silencing mediator for retinoic acid receptor (RAR) and TR  
SR-BI: "Scavenger receptor class B" I  
SRC: steroid receptor coactivator  
SREBP : sterol response element binding protein  
T<sub>3</sub> : Triiodothyronine  
TG : triglycéride  
THRA :Thyroid hormone receptor A gene  
THRB : Thyroid hormone receptor B gene  
TR : T<sub>3</sub> receptor  
TRE : T<sub>3</sub> response element  
USF : upstream stimulatory factor  
VHDL : Very high density lipoprotein  
VLDL : Very low density lipoprotein  
X5P : xylulose 5-phosphate

## RÉSUMÉ

L'organisme synthétise les lipides *de novo* au niveau hépatique, les transforme en triglycérides, et les stocke dans le tissu adipeux. Les lipides servent à de nombreuses fonctions biologiques essentielles, telles la synthèse de membrane ou d'hormone, mais aboutissent à un excès de masse corporelle lorsqu'il y a déséquilibre. L'acide gras synthase (FAS) est une enzyme clé de la lipogenèse. Elle synthétise le palmitate à partir d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA en présence de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Comprendre ses mécanismes de régulation est important dans l'optique de moduler son activité. La FAS est régulée positivement par la triiodothyronine ( $T_3$ ) et l'insuline, l'effet est inhibé par les MCFA. La régulation est essentiellement transcriptionnelle. Muter le gène *FAS*, afin de l'éteindre, est létal. L'inhibition partielle à l'aide d'agents tel le C75 serait donc préférable. Malheureusement, en plus d'avoir des effets anorexiques réversibles pour C75, ces agents ont des effets neurotoxiques dévastateurs. L'inhibition partielle de la FAS par des nutriments, tels les acides gras à chaîne moyenne (MCFA), serait une solution. Le présent projet propose d'élucider les mécanismes moléculaires par lesquels les hormones modulées par la diète, telles l'insuline et la triiodothyronine  $T_3$ , influencent l'activité de la FAS et comment les MCFA inhibent cette stimulation hormonale. Comme l'effet hormonal ne semble pas être totalement transcriptionnel et qu'une implication du glucose au niveau post-transcriptionnel a aussi été suggérée, nous avons analysé l'effet de l'insuline et de la  $T_3$  sur la stabilisation des ARN messagers et sur l'activité enzymatique de la FAS en utilisant des milieux à haute ou basse concentration en glucose. Cependant, nous n'avons pas observé de différence significative, peu importe la concentration de glucose dans le milieu de culture. Des études préalables ont aussi démontré un rôle de la phosphorylation sur la régulation transcriptionnelle de la FAS par l'insuline et le  $T_3$ . Nous avons investigué ce rôle sur l'activité de la FAS à l'aide d'inhibiteurs spécifiques. En utilisant PD98058, un inhibiteur spécifique de MEK, nous avons observé une implication de Erk1/2 dans l'induction de FAS. Avec LY 294002, un inhibiteur spécifique de PI3Kinase (PI3K), nous observons une inhibition de la FAS en présence de  $T_3$ , ce qui impliquerait la voie PI3K dans l'activation de la FAS induite par la  $T_3$ . Des études préliminaires ont montré que l'inhibition de la FAS par les MCFA se faisait très rapidement. Une courbe d'inhibition en fonction du temps a été effectuée et a révélé une inhibition dans les premières 30 minutes d'exposition. Des études de captation ont montré que les MCFA étaient absorbés par les hépatocytes. Un profil lipidique a montré que les MCFA sont métabolisés pour se retrouver dans la fraction lipidique correspondant aux triglycérides, qui nous a donné une idée des voies métaboliques empruntées. L'acide bétulinique, un inhibiteur de la CPT1, ainsi que l'Etomoxir, un inhibiteur de la DGAT, ne semble pas avoir d'effet sur l'inhibition de la FAS induite par les MCFA en présence d'insuline et de  $T_3$ , contrairement à la Triacsin C, un inhibiteur des acyl-CoA synthases, qui abolit l'effet inhibiteur. En dernier point, nous avons vérifié l'impact de la famille des « scavenger receptors » de classe B tels que SR-BI dans le transport sélectif et la captation de MCFA par la cellule. Ces derniers ne semblent aucunement impliqués dans le transport des MCFA contrairement à nos attentes.

**Mots-clés :** FAS, MCFA, acyl-CoA, insuline,  $T_3$

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

De nos jours, l'obésité est devenue un problème global de santé publique avec des conséquences des plus sévères. Autrefois, cette condition physique était considérée comme un problème visant uniquement les pays industrialisés. Aujourd'hui, les pays en voie de développement sont tout autant concernés par ce phénomène inquiétant. Cela est dû principalement à un changement du type d'alimentation, à voir moins de légumes et plus de graisses, sucres et sel, ainsi qu'à un mode de vie de plus en plus sédentaire (WHO/OMS, 2000). D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, plus d'un milliard de personnes souffrent à l'heure actuelle d'un excès de poids, et une augmentation d'un demi-milliard d'ici 2015 est attendue si la situation n'est pas contrôlée. (WHO/OMS, 2000). Au Canada, en 2004, 23% de la population adulte était obèse, dont 26% sont des jeunes de 2 à 17 ans (Canada, 2006). L'excès de poids et l'obésité sont souvent associés à de nombreux problèmes de santé tels que les maladies cardiovasculaires, les accidents cérébraux, divers cancers, le diabète de type II et diverses autres maladies chroniques (Mann, 1974b, Mann, 1974a, McGarry and Dobbins, 1999, Wajchenberg, 2000). Tout cela mène à un investissement important des gouvernements afin de lutter contre tous ces problèmes de santé associés. Il devient donc indispensable d'élucider les mécanismes impliqués dans le développement de ce syndrome métabolique.

Dans la famille des lipides, se trouvent différentes espèces qui ont des rôles biologiques très spécifiques. D'un côté, il y a les graisses et les huiles qui servent essentiellement à faire des réserves d'énergie dans le corps. D'un autre côté, les phospholipides, les stérols et les glycolipides servent de matières premières dans la formation des membranes cellulaires (Zubay, 1983). Il y a également une catégorie de lipides, tels que les androgènes, les œstrogènes, et les glucocorticoïdes qui ont essentiellement une fonction hormonale. Lorsque l'apport énergétique est de loin supérieur au besoin journalier une réserve d'énergie se fait sous la forme de dépôt de graisse dans les cellules adipeuses. Ce dépôt se fait sous forme de triglycérides, ce qui cause l'augmentation de l'adiposité. La synthèse *de novo* des acides gras et en particulier des triglycérides est un procédé qui a lieu dans le cytoplasme de la cellule hépatique chez l'être humain. Cette synthèse est régulée à la fois par les hormones et la diète (Back et al., 1986, Goodridge, 1986, Goodridge et al., 1986,

Hillgartner and Charron, 1998). Cette régulation se fait essentiellement au niveau des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des lipides.

L'objectif du présent projet est l'étude de la régulation de la FAS par les MCFA, et plus précisément le mécanisme impliqué dans l'inhibition observée en présence d'insuline, de  $T_3$  et de ces acides gras. Le but principal de cette étude vise à identifier le mécanisme d'action de l'hexanoate, un MCFA, sur l'activité de l'acide gras synthase, induite par la  $T_3$ , une hormone thyroïdienne, et l'insuline.

Pour ce faire, il est important de comprendre la totalité des mécanismes qui régissent la régulation de la FAS. L'inhibition de cette enzyme pourrait être d'une importance majeure dans la lutte contre l'obésité, via une réduction de la lipogenèse. L'identification d'inhibiteur de type nutritionnel pour la FAS serait un procédé thérapeutique et pharmacologique prometteur pour lutter activement contre cette pandémie qu'est l'obésité.

# **ÉTAT DES CONNAISSANCE**

## ETAT DES CONNAISSANCES

### I. Métabolisme des acides gras

#### a. La synthèse hépatique des acides gras

Chez l'humain comme chez les oiseaux, la lipogenèse se fait principalement au niveau hépatique (Goodridge, 1973), contrairement aux rongeurs, où elle a lieu dans le foie ainsi que dans les tissus adipeux. Les acides gras, indispensables au bon fonctionnement cellulaire, sont en effet les constituants principaux des membranes sous forme de phospholipides et sont aussi utilisés pour le métabolisme de la cellule et la transduction des signaux par des intermédiaires hormonaux. Les hormones stéroïdiennes, telles que l'œstrogène, la progestérone, la testostérone, l'aldostérone et le cortisol, sont en effet synthétisées à partir du cholestérol. Ce dernier est formé de dérivés d'acides gras appelés, acétyl-CoA.

De plus, les acides gras constituent une ressource énergétique considérable pour le corps. En effet, le stockage du surplus énergétique se fait sous forme de triglycérides, une forme très efficace de réserve pour l'organisme.

#### i. Initiation de la synthèse des acides gras

L'acétyl-CoA est le substrat majeur de la synthèse des acides gras (Murray et al., 1995, Zubay, 1983). Il est la source de tous les atomes de carbones des acides gras et provient de la décarboxylation oxydative du pyruvate par le cycle de Krebs, de la dégradation oxydative de certains acides aminés ou encore de la  $\beta$ -oxydation des acides gras à longue chaîne (*fig. 1*).



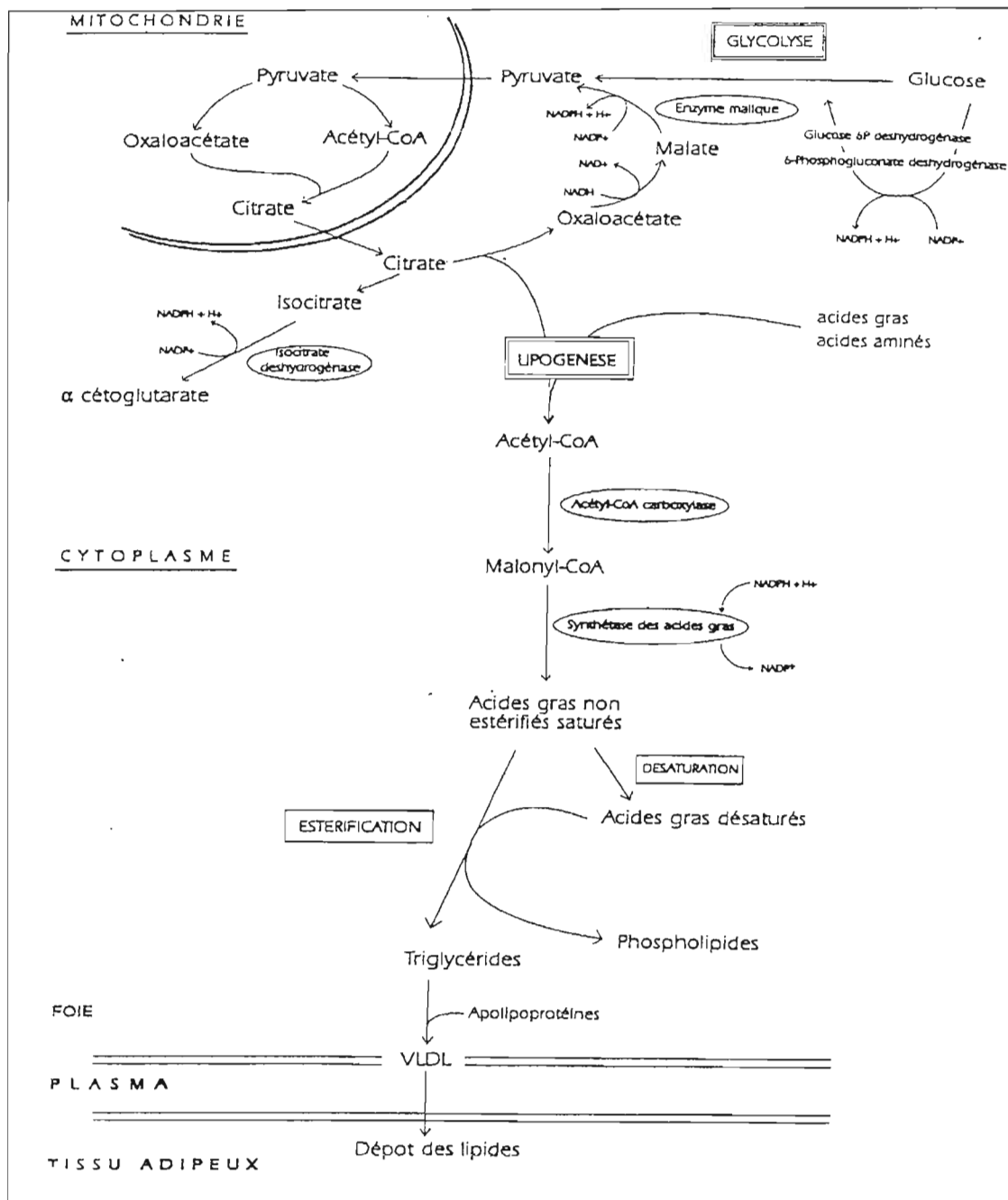


Figure 1 : Principales étapes de la synthèse des acides gras au niveau hépatique (Mounier, 1994)

L'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la synthétase des acides gras (FAS) sont les deux enzymes clés de la lipogenèse qui assurent la conversion de l'acétyl-CoA en palmitate

de manière irréversible. L'acétyl-CoA, produit dans la mitochondrie, est ensuite exporté dans le cytoplasme. La citrate synthase convertit alors l'acétyl-CoA et l'acide oxaloacétique en citrate, qui traverse la membrane de la mitochondrie par l'intermédiaire du système de transport tricarboxylate. L'acétyl-CoA est régénérée dans le cytoplasme par l'action de l'ATP citrate lyase (Zubay, 1983).

Dans la première étape de la synthèse des acides gras, l'acétyl-CoA est carboxylée en malonyl-CoA en présence d'ATP par l'acétyl-CoA carboxylase, utilisant la biotine comme cofacteur (*fig. 2*). La synthèse du malonyl-CoA se fait en deux temps. Tout d'abord, la biotine est carboxylée, ce qui requiert de l'ATP. Ensuite, le groupement carboxyle est transféré de la biotine à l'acétyl-CoA pour former le malonyl-CoA (Murray et al., 1995).

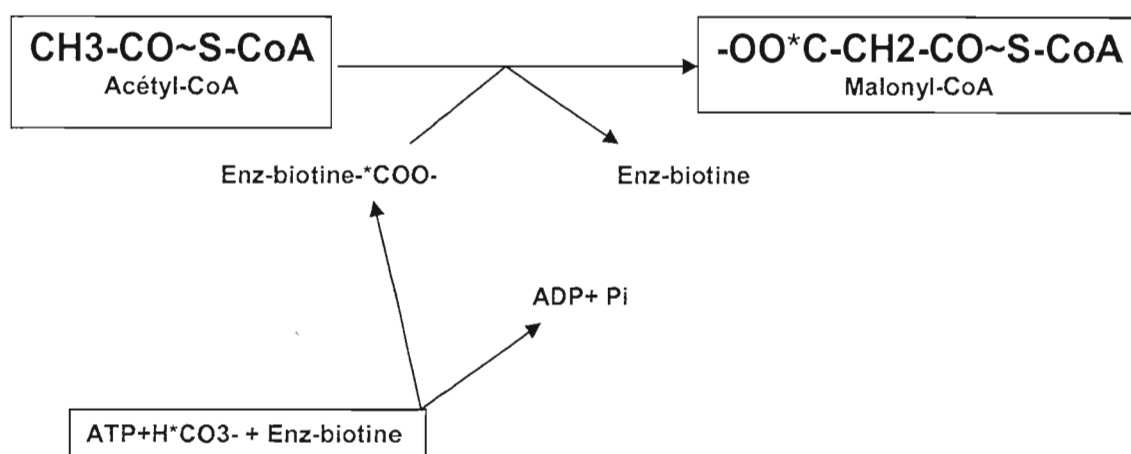
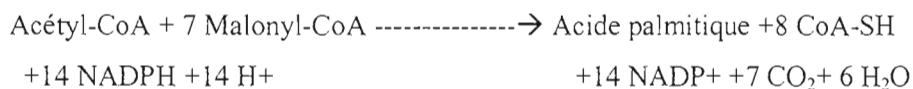


Figure 2: Biosynthèse du malonyl-CoA (Murray et al., 1995). Enz = acétyl-CoA carboxylase, \* = groupement carboxyle

Dans la deuxième étape, les acides gras sont synthétisés par l'action de la FAS sur le malonyl-CoA et l'acétyl-CoA. La FAS catalyse la formation des acides gras saturés tels que l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0) et cela en sept réactions :



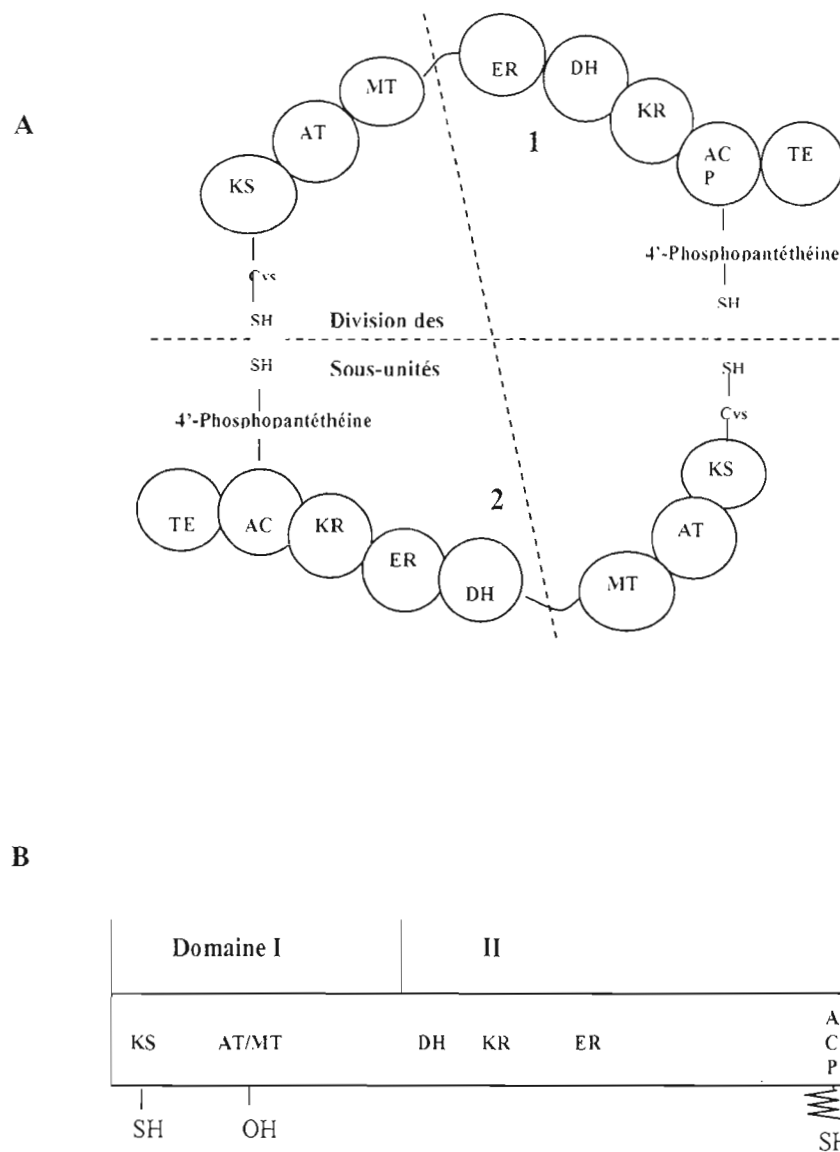
## ii. Protéine FAS

Chez la plupart des eucaryotes, la synthèse des acides gras saturés à longue chaîne se fait par l'action d'un complexe multienzymatique appelé FAS (Murray et al., 1995) et non par des enzymes indépendantes, comme c'est le cas chez les procaryotes et les plantes. La FAS est une enzyme de poids moléculaire de 500 kDa, constituée de deux sous-unités identiques de 250 kDa liées par deux groupements thiols (Stoops et al., 1975). Chaque sous-unité est constituée d'une chaîne polypeptidique comportant sept activités enzymatiques de la FAS : la malonyl transacylase, l'acétyl transacylase, la  $\beta$ -cétacyl synthase (enzyme condensante), la déshydratase, l'énoyl réductase, la cétacyl réductase, l'acyl « carrier protein » (ACP) et la thioestérase (*fig. 3.A*).

La région de 230 kDa, constituant le cœur de la protéine, a été séparée par protéolyse en deux domaines (Tsukamoto et al., 1983). Le domaine I (transacylase) contient la  $\beta$ -cétacyl synthase. Celle-ci correspond à la partie amino-terminale de la FAS. Toujours dans le domaine I, on trouve les sites actifs de l'acétyl-malonyl transacylase (*fig. 3.B*). Le domaine II quant à lui comprend les deux fonctions réductase de la FAS : l'énoyl réductase (ER) et la  $\beta$ -cétacyl réductase (KR). Le domaine ACP a été localisé dans la partie carboxyle-terminale du domaine II (Witkowski et al., 1987). Celui-ci sert de site d'encrage au nouvel acide gras durant l'élongation. Il comporte un bras long et flexible, le fragment 4' phosphopantéthéine, sur lequel est fixé l'acide gras en cours de synthèse. La thioestérase, de poids moléculaire de 33 kDa, a été localisée dans le domaine III (Holzer et al., 1989).

La structure multifonctionnelle de cette enzyme présenterait de nombreux avantages puisque les intermédiaires de la synthèse sont directement transférés d'un site à l'autre et ne sont pas dilués dans le cytosol. De plus, dans un tel complexe, les modifications allostériques d'un site, suite à la liaison d'un substrat, peuvent être communiquées à un autre site et affecter son activité. Ainsi, Moore et ses collègues avaient noté que les activités de l'énoyl réductase (ER) et de la cétacyl réductase (KR), des enzymes impliquées dans des réactions de réduction, nécessitent deux molécules différentes de NADPH. Des substitutions d'acides aminés du site de liaison de l'ER réduisaient l'activité catalytique de la KR (Moore et al., 2005).

Seule la forme dimérique de l'enzyme est active. La dissociation de l'enzyme en monomères conduit à l'inactivation enzymatique de la FAS (Lornitzo et al., 1975, Stoops et al., 1975). Cependant sous forme monomérique, seule l'activité de la  $\beta$ -cétoacyl synthase est perdue alors que les autres activités sont conservées (Butterworth et al., 1967). En fait, l'activité de la FAS dépend de l'association étroite des groupements thiols de la  $\beta$ -cétoacyl synthase et du domaine ACP portés par l'une et l'autre des sous unités (Stoops and Wakil, 1981b, Stoops and Wakil, 1981a). Donc, afin de minimiser la dissociation et pouvoir mesurer l'activité enzymatique de la FAS, la lyse cellulaire est réalisée dans du tampon phosphate, qui stabilise cette association (Stoops et al., 1975).



**Figure 3 : Localisation des sites fonctionnels du complexe multienzymatique de l'acide gras synthase. A, Complexe multienzymatique de l'acide gras synthase (Murray et al., 1995)** Le complexe est un dimère formé de deux monomères identiques. Le -SH de la 4'-phosphopantéthéine d'un monomère est dans le voisinage du -SH de la cystéine de la  $\beta$ -cétosynthase de l'autre monomère. Chaque monomère renferme toutes les activités partielles de la séquence des réactions, mais la véritable unité fonctionnelle est formée d'un demi-monomère réagissant avec la moitié complémentaire de l'autre. **B, Localisation des sites fonctionnels de l'acide gras synthase (Holzer et al., 1989).** TE : Thioestérase ; ACP : "Acyl carrier protein", ER : Enoyl réductase ; KR :  $\beta$ -cétosynthase ; DH :  $\beta$ -hydroxyacyl déshydratase ; AT/MT : acétyl/malonyl transacylase ; KS :  $\beta$ -cétosynthase.



## **b. La transformation des acides gras**

### **i. Désaturation**

La FAS produit deux acides gras à longues chaînes saturées, l'acide palmitique et l'acide stéarique. Ceux-ci subissent une désaturation, par introduction d'une double liaison, au niveau de la position  $\Delta 9$  donnant ainsi l'acide palmitoléique et oléique, respectivement. Dans le réticulum endoplasmique, la stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1), la NADH-cytochrome b5 réductase, le cytochrome b5 ainsi que de l'oxygène, du NADPH ou du NADH sont nécessaires pour catalyser cette réaction (Murray et al., 1995). La SCD1 ne produit que des acides gras monoinsaturés. Pour obtenir des acides gras hautement insaturés (HUFA – « highly unsaturated fatty acids »), il faut l'intervention de la  $\Delta 5$  désaturase (D5D) et  $\Delta 6$  désaturase (D6D) (Nakamura and Nara, 2004). Ces dernières introduisent des désaturations à leur position respective. La D6D est liée à la membrane et catalyse la synthèse d'acides gras polyinsaturés (PUFA) (Nakamura and Nara, 2004). La D5D catalyse la synthèse de HUFA. Après désaturation par D6D et élongation par élongase, la D5D introduit une double liaison à la position  $\Delta 5$  (*fig.5*) (Nakamura and Nara, 2004).

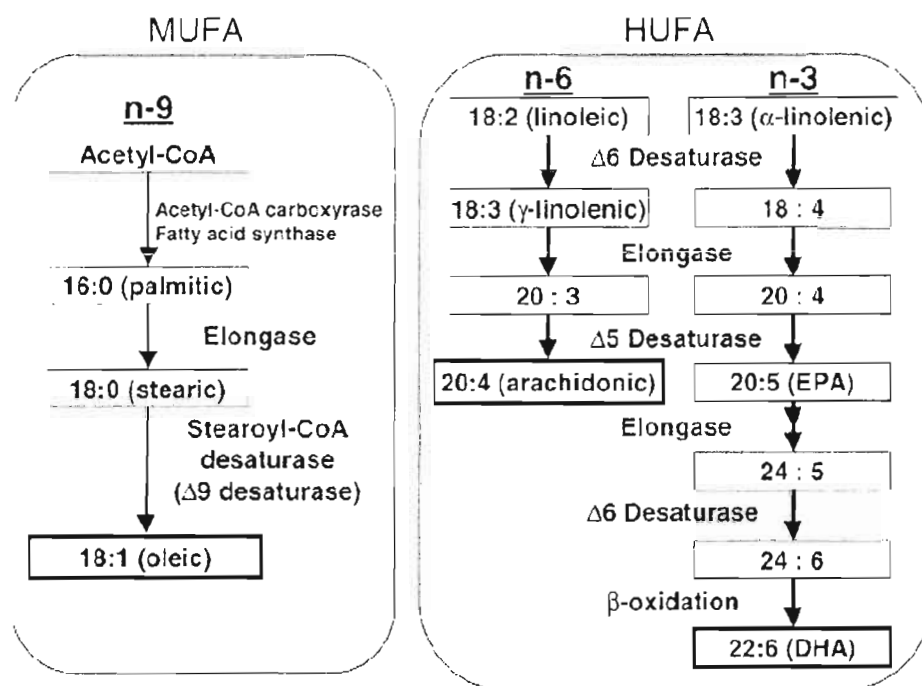


Figure 5 : Synthèse d'acides gras insaturés. EPA, acide eicosapentanoïque, DHA, acide docosahexanoïque (Nakamura and Nara, 2004)

## ii. Estérification

L'estérification est l'étape suivante qui va transformer les acides gras synthétisés en triglycérides (TG), la forme de réserve d'énergie de l'organisme, emmagasinée dans le tissu adipeux. Le glycérol-3-phosphate engendre une série de réactions impliquant plusieurs enzymes (*fig. 6*), qui aboutit à la synthèse des TG. En effet, les acides gras à longue chaîne synthétisés ainsi que ceux provenant de l'alimentation seront acylés, par l'acyl CoA transférase appropriée, afin de pouvoir continuer dans la voie de l'estérification (Bach and Babayan, 1982).



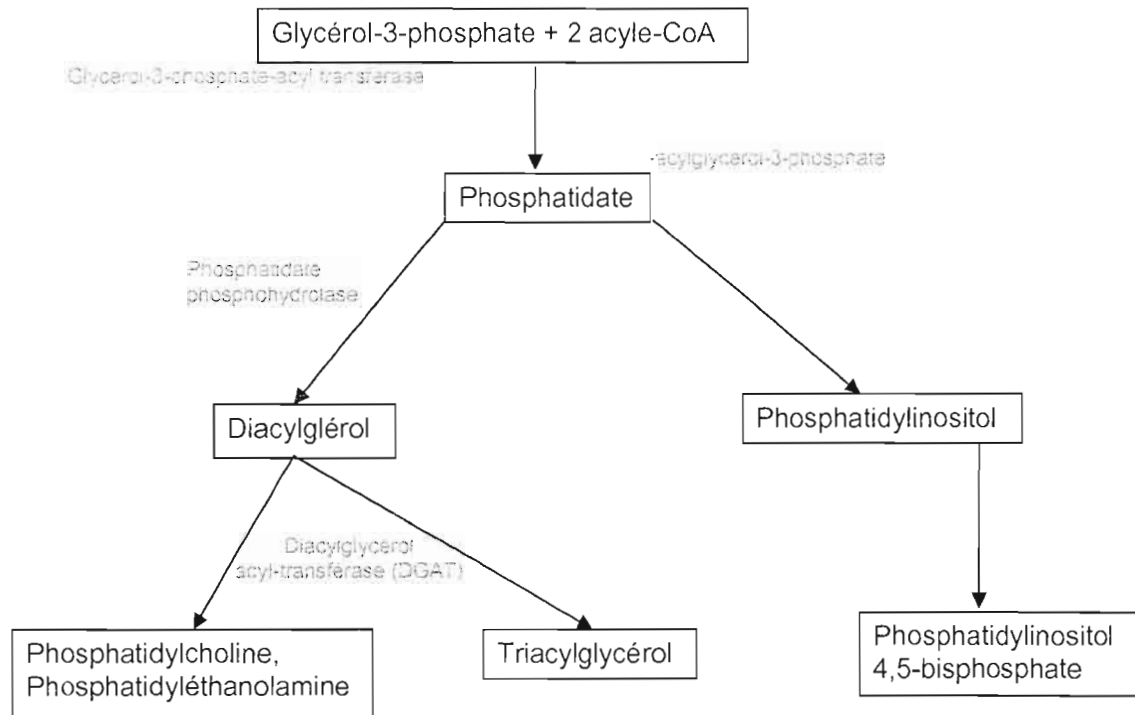


Figure 6 : Synthèse des triacylglycérols et phospholipides, adaptée de Hillgartner et Charron, 1998 (Hillgartner and Charron, 1998)

Après l'estérification, les triglycérides sont exportés vers les autres tissus pour y être soit utilisés, soit entreposés. Pour ce faire, ils sont d'abord associés aux apoprotéines, en particulier à l'apoprotéine B100, afin de former des lipoprotéines qui sont plus solubles et transportables dans le plasma (Zubay, 1983). Les lipoprotéines qui assurent le transport des triglycérides hors du foie sont les VLDL (« very low-density lipoprotein ») (Zubay, 1983).

### iii. Devenir des acides gras ou la $\beta$ -oxydation

La dégradation des acides gras se fait par l'intermédiaire de la  $\beta$ -oxydation dans la mitochondrie. Les acides gras sont tout d'abord activés en dérivés d'acyl-CoA au niveau de la membrane par l'acyl-CoA synthétase, en présence d'ATP, pour être soit estérifiés ou oxydés (Bach and Babayan, 1982).

Dans la voie de l'oxydation, à l'aide de la carnitine palmitoyl-transférase I (CPT1), les acyl-CoA à longues chaînes peuvent traverser la membrane mitochondriale et être

restitués par la palmitoyl-transférase II. Ces acyl-CoA sont alors oxydés pour fournir de l'énergie à la cellule (*fig. 7*). Cette oxydation est souvent associée à l'état de jeûne ou à une réduction de la concentration d'insuline.

Les acides gras qui sont estérifiés ou  $\beta$ -oxydés dans le foie sont dérivés des acides gras libres dans le plasma, de la synthèse *de novo* des acides gras et des processus lipolytiques intra-hépatiques (Bach and Babayan, 1982). Les contributions relatives de ces différentes sources d'acides gras, pour une utilisation dans le foie, sont variables et sous un contrôle nutritionnel et hormonal.

Les acides gras qui entrent dans la voie de l'estérification sont retenus dans les hépatocytes pour la formation des phospholipides membranaires et le stockage dans les gouttelettes de triglycérides où ils sont sécrétés sous forme de lipoprotéines riches en triglycérides. Une inhibition de la lipogenèse *de novo* se traduit par une augmentation de l'oxydation des acides gras et de la céto-genèse, une diminution de la synthèse de triglycérides, et une diminution de production de VLDL (Fukuda and Ontko, 1984). Lorsque la voie de l'estérification est stimulée, la  $\beta$ -oxydation est inhibée.

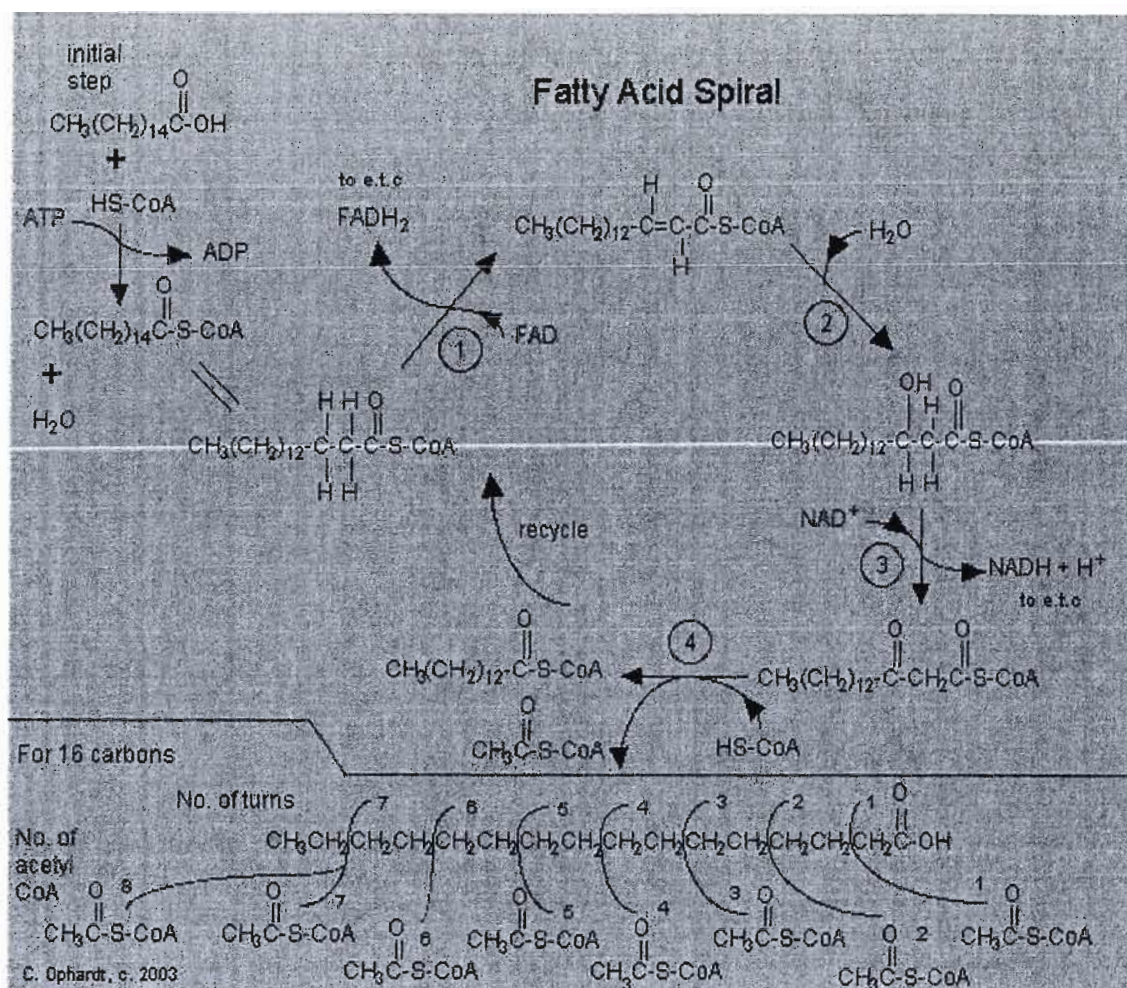


Figure 7 :  $\beta$ -oxydation des acides gras. (E.Ophardt, 2003)

#### iv. Métabolisme particulier des MCFA

Les MCFA sont liquides à la température de la pièce, relativement solubles dans l'eau. Ils sont de faibles électrolytes et sont très ionisés à pH neutre, ce qui augmente leur solubilité dans les fluides biologiques (Bach and Babayan, 1982). Ces acides gras ne se lient pas facilement à la protéine de liaison des acides gras (FABP - fatty-acid-binding protein) et ne sont pas facilement estérifiés (Bach and Babayan, 1982). Cependant, les MCFA sont transportés sous forme soluble liés à l'albumine, bien que ce lien ne se forme pas aussi facilement qu'avec les acides gras à chaînes longues (Bach and Babayan, 1982). La majorité des MCFA de l'alimentation sont retenus dans le foie (Bach and Babayan,

1982). Ils semblent pénétrer dans les hépatocytes de façon passive, par simple diffusion. Les MCFA, une fois dans les hépatocytes, doivent être métabolisés (*fig. 8*). Ils traversent ensuite très rapidement la double membrane de la mitochondrie sans avoir besoin de la présence de carnitine. Dans la matrice mitochondriale, les MCFA sont acylés par une acyl-CoA synthétase spécifique (par exemple, l'octanoyl-CoA synthétase pour l'acide octanoïque). Ces acyl-CoA mitochondriaux subissent une  $\beta$ -oxydation permettant ainsi la production d'acétyl-CoA qui va entrer dans les différentes voies métaboliques dans la mitochondrie ainsi que dans le cytosol (Bach and Babayan, 1982).

Dans la mitochondrie, une fraction de l'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs et est oxydée en  $\text{CO}_2$ . Une grande partie de l'acétyl-CoA est transformée en corps cétoniques (cétogenèse) et une petite fraction sert à l'élongation des acides gras. Le reste des acétyl-CoA produits est transporté vers le cytosol et peut être utilisé pour la synthèse *de novo* d'acides gras et de cholestérol (Bach and Babayan, 1982).

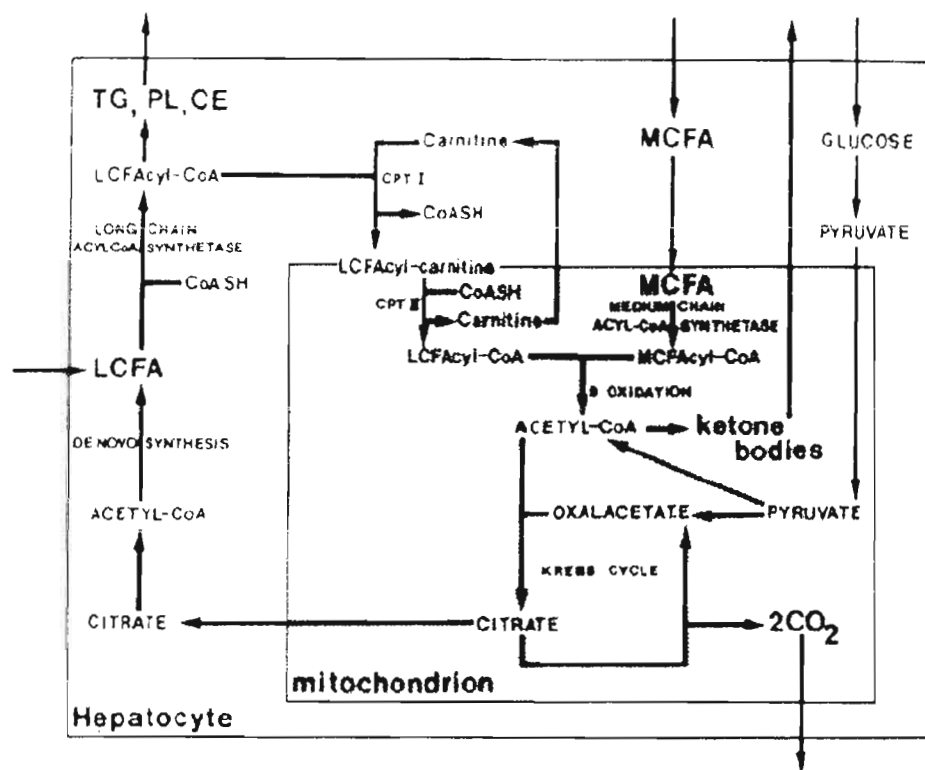


Figure 8 : Métabolisme hépatique des acides gras. (Bach and Babayan, 1982) TG, triglycérides , PL, phospholipide : CE, cholestérol estérifiés; CPT, carnitine palmitoyl transférase

### c. Transport des acides gras et captation

L'albumine est le principal transporteur des acides gras dans le plasma. Elle constitue 50% des protéines dans le plasma. Cette protéine a un poids moléculaire de 66 200 Da et une chaîne polypeptidique unique comprenant 17 ponts disulfures. Chaque molécule d'albumine est capable de lier 10 molécules d'acides gras. Les acides gras à chaînes plus longues se lient plus facilement à l'albumine que ceux à chaînes plus courtes. Le complexe acide gras à longue chaîne et albumine rend ces premiers plus solubles (Zubay, 1983). Cependant, ce mécanisme n'est pas l'unique mode de transport des acides gras.

L'albumine lie les MCFA de manière beaucoup moins efficace. Il est donc plus rare que ces derniers empruntent cette voie afin de pénétrer la membrane cellulaire.

Le système de transport par lipoprotéines est un autre exemple du transport facilité des acides gras. Il fournit les tissus en lipides, surtout la composante acides gras des triglycérides, pour l'emmagasiner ou l'oxydation. Les lipoprotéines sont des sphères de diamètre décroissant, mais à densité croissante. Elles sont constituées d'un centre liquide de lipides hydrophobes (triglycérides, esters de cholestérol) et d'une portion externe de lipides amphiphiles (phosphatidylcholine, cholestérol et apolipoprotéines) qui sont en contact avec le plasma. Ces lipoprotéines sont classées par ordre croissant de densité : les chylomicrons, les VLDL, les LDL (« low-density lipoprotein »), les IDL (« intermediate-density lipoprotein »), les HDL (« high-density lipoprotein ») et les VHDL (« very high-density lipoprotein »). En 24 heures, 70 à 150 g de triglycérides sont ainsi transportés de l'intestin et du foie vers les autres tissus (Zubay, 1983). Les chylomicrons sont les lipoprotéines qui transportent les acides gras depuis l'intestin, alors que les VLDL se chargent du transport à partir du foie (Brown et al., 1981).

Les acides gras peuvent avoir plusieurs sources, telle la diète, le tissu adipeux ou encore la lipogenèse hépatique. En effet dans le système de transport exogène des lipides, ces derniers sont incorporés par l'intestin en chylomicrons qui se lient à la lipoprotéine lipase afin de libérer des acides gras et des monoglycérides, et cela dans un temps très court (demi-vie du chylomicron - 4 à 5 minutes) (Brown et al., 1981). En se débarrassant des triglycérides, le chylomicron rétrécit, mais retient son ester de cholestérol et ces apolipoprotéines (Brown et al., 1981). Il se dirige vers le foie, où il se lie à un récepteur à la surface de la cellule hépatique. Par endocytose, il est immédiatement internalisé et dégradé dans les lysosomes (Brown et al., 1981). Le système de transport endogène des lipides implique le foie, où ces derniers sont incorporés dans les lipoprotéines pour le transport vers le tissu adipeux (Brown et al., 1981). Les VLDL produites interagissent avec la lipoprotéine lipase dans les capillaires, libérant la plus grande partie des triglycérides (demi-vie de la VLDL - 1 à 3 heures) (Brown et al., 1981). Ces VLDL épuisées peuvent entrer directement dans la cellule ou se transformer en LDL et intégrer la cellule, tout cela en s'associant au récepteur de LDL. Elles seront par la suite acheminées aux lysosomes, où elles seront dégradées en libérant du cholestérol, entre autres (Brown et al., 1981). FAT/CD36, un récepteur de classe B, est une protéine de 88 kDa, qui se retrouve sur les membranes des cellules des tissus utilisant beaucoup d'acides gras, tels les hépatocytes (Abumrad et al.,

1998). Ce dernier semblerait contribuer au transport direct à travers la membrane. CD36 est impliqué entre autres dans le transport des acides gras à longue chaîne et des LDL oxydées (Chirala et al., 2003). Dans les souris génétiquement obèses, le niveau d'ARN messager de CD36 dans le foie est 15 fois plus élevé que dans les souris normales. Cette protéine est recrutée des sites intracellulaires à la membrane en réponse à l'insuline (Black and DiRusso, 2003). Lorsque ces lipides entrent dans la cellule, par endocytose du complexe, ils sont dégradés et produisent des acides gras. SR-BI, un autre récepteur « scavenger » de classe B, serait impliqué dans le transport des acides gras et plus précisément comme récepteur pour les HDL (Trigatti et al., 2003), dans la captation sélective des esters de cholestérol des LDL et la captation sélective du cholestérol des HDL (Rhainds et al., 2003). On le trouve sur les tissus impliqués dans le métabolisme du cholestérol, et donc à la surface des hépatocytes où est synthétisé ce dernier (Rhainds and Brissette, 1999). Lorsque ces lipides intègrent la cellule et sont hydrolysés, ils génèrent également des acides gras et du cholestérol, entre autre, qui seront par la suite utilisés dans la formation de nouvelles lipoprotéines, ou encore excrété en ce qui concerne le cholestérol (Brown et al., 1981). Le rôle de ces récepteurs dans la captation des MCFA, et en particulier celui de SR-BI, n'est pas encore caractérisé, vu que ces derniers peuvent possiblement traverser la membrane cellulaire par simple diffusion (Bach and Babayan, 1982).

## II. Régulation de la FAS

### a. Le gène *FAS*

Le gène *FAS*, chez l'humain, se trouve sur le chromosome 17 au locus 17q25. Il code pour l'enzyme FAS, essentielle à la survie de l'organisme. En effet, cette protéine est indispensable au développement embryonnaire. La tentative d'obtention de souris KO pour le gène *FAS* a montré que l'oblitération de l'expression du gène était létale avant même l'implantation dans l'utérus (Chirala et al., 2003). Chez l'oie, la région codante du gène est localisée sur environ 40 kpb alors que la taille totale du gène est de 50 kpb (Kameda and Goodridge, 1991). Chez le rat, le gène fait 20 kpb comportant 43 exons dont 42 sont codants (Amy et al., 1992). Chaque domaine catalytique de l'enzyme est codé par des exons



spécifiques. Les exons 2 à 8 codent pour le domaine  $\beta$ -cétosynthase. Les exons 9 à 15 codent pour l'acétyl/malonyl transacylase (Amy et al., 1992, Beck et al., 1992). Les exons 16 à 21 codent pour le domaine  $\beta$ -hydroxyacyl déshydratase. Les exons 29 à 32 codent pour l'énoyl réductase, les exons 33 à 37 pour le domaine  $\beta$ -cétoréductase, l'exon 38 pour l'ACP et les exons 39 à 43 pour la thioestérase.

L'expression du gène de la FAS est régulée par les hormones et les nutriments (Goodridge, 1973). Dans le promoteur du gène du rat, on a identifié la présence d'éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE), aux œstrogènes (ERE), à la  $T_3$  (TRE) (Amy et al., 1992, Beck et al., 1992) ; dans celui de l'oie, la présence de sites consensus TRE, GRE et de site de fixation de C/EBP ("CAAT enhancer binding protein") a été observée (Kameda and Goodridge, 1991). Nous avons au laboratoire clairement identifié la présence d'un site TRE sur le gène de l'oie entre -741 et -696 pb (Radenne et al., 2008).

L'ARNm de la FAS est détectée en quantité abondante au niveau hépatique chez diverses espèces mais aussi dans d'autres tissus comme le tissu adipeux, le placenta, le cœur, les poumons ou encore le cerveau (Goodridge, 1973, Marseille-Tremblay, 2006). La modulation nutritionnelle ou hormonale de la quantité d'ARNm n'est cependant observée qu'au niveau hépatique (Clarke, 1993, Laux and Schweizer, 1990). Cette modulation spécifique au niveau du foie nous permettrait donc d'envisager une inhibition de la synthèse *de novo* des acides gras sans atteinte au niveau d'autres tissus où elle peut être critique tel que lors de la synthèse de surfactant au niveau des poumons.

## **b. La régulation hormonale**

### **i. Régulation de la FAS par l'insuline**

L'insuline est une hormone synthétisée sous forme de précurseur au niveau du pancréas. Cette molécule subit ensuite deux clivages pour devenir opérationnelle et est emmagasinée dans des granules de sécrétion (Hall et al., 1990). La sécrétion d'insuline est régulée physiologiquement par l'augmentation du taux plasmatique de glucose.

L'insuline est très impliquée, entre autres, dans le métabolisme du glucose mais elle joue également un rôle important dans la synthèse de glycogène, dans la mitogenèse et dans



la transcription de nombreux gènes (Mounier and Posner, 2006). Cette hormone peptidique synthétisée dans le pancréas par les cellules  $\beta$  peut avoir des effets positifs ou négatifs sur l'expression des gènes, particulièrement dans le foie, un organe cible majeur de l'insuline (Williams and Larsen, 2003). Elle favorise le transport du glucose et des acides aminés, la transformation des sucres en glycogène et triglycérides. Elle agit sur la cellule en se fixant sur son récepteur au niveau de la membrane, ce qui induit un changement de conformation de celui-ci (Mounier and Posner, 2006). Ce changement active différentes voies de signalisation dans la cellule (*fig. 9*). L'insuline module donc la transcription des gènes en influençant le niveau d'expression, la localisation, la fixation et l'activité transcriptionnelle de nombreux facteurs de transcription qui se fixent sur des éléments de réponse à l'insuline situés pour la grande majorité dans les régions promotrices de gènes (Zhang, 2002). Au niveau hépatique, les facteurs de transcription qui médient l'action inhibitrice de l'insuline sont surtout majoritairement des facteurs appartenant à la famille des *Foxo* tandis que l'action positive est particulièrement médiée par le facteur SREBP-1 (« sterol-response-element-binding protein ») (Mounier and Posner, 2006).

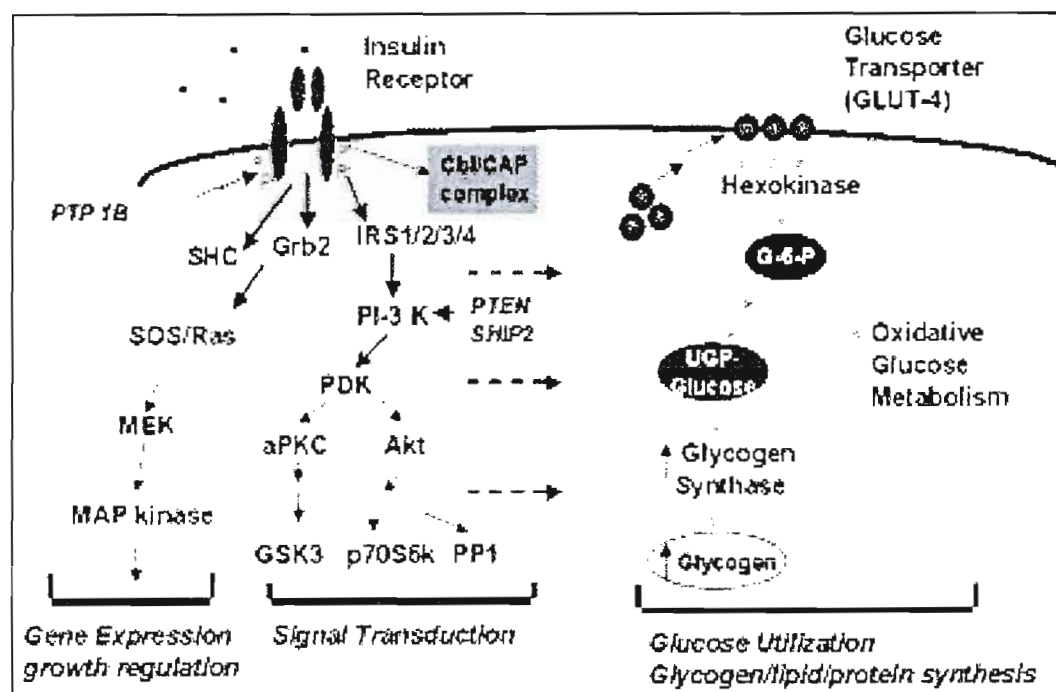


Figure 9 : Voies de signalisation activées par l'insuline et réponses physiologiques. (Zhang, 2002)

Dans le foie, l'insuline a un effet inducteur sur plusieurs enzymes lipogéniques, dont la FAS (Hillgartner and Charron, 1998). Le premier IRE (« insulin-response-element ») caractérisé dans le promoteur du gène FAS était le -65E-box qui lie les facteurs de transcription USF-1 et 2 (« upstream stimulatory factor »). L'induction maximale par l'insuline requiert cependant deux autres sites de liaison pour la protéine SREBP-1c. L'insuline induit la transcription de la FAS en augmentant la production de SREBP-1c, qui se lie sur un élément SRE situé à -150 bp. De plus elle interagit aussi avec les USF afin d'assurer une forte activité transcriptionnelle. Il semblerait aussi que les NF-Y et Sp1 soient également impliqués dans la régulation de la transcription du gène FAS en réponse à l'insuline et aux glucides (*fig. 10*) (Mounier and Posner, 2006).

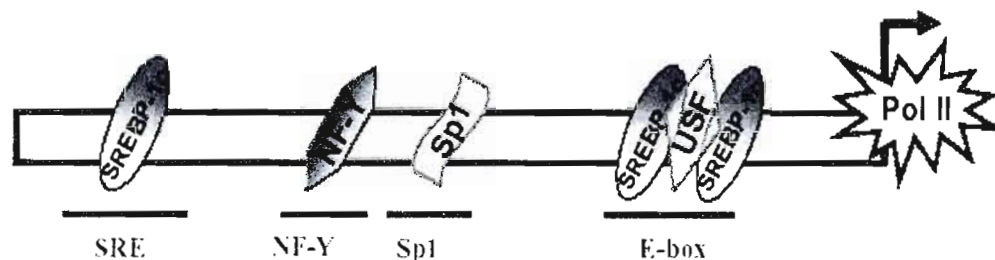


Figure 10 : Sites de réponse à l'insuline sur le promoteur du gène FAS (Mounier and Posner, 2006)

## ii. Régulation de la FAS par la $T_3$

La différenciation cellulaire, l'expression des gènes, le développement et même le métabolisme sont régulés par les hormones thyroïdiennes. La glande thyroïde produit deux hormones : la 3,5,3'  $T_3$  et la 3,5,3',5' tétraiodothyronine ( $T_4$  ou thyroxine) à partir de la thyroglobuline. Cette molécule précurseur est iodinée sur les résidus tyrosine pour former des mono- et diiodotyrosines (MIT, DIT) qui sont par la suite couplées pour donner la  $T_3$  et la  $T_4$ . Dans l'organisme, la  $T_4$  est plus abondante que la  $T_3$ , mais cette dernière a une plus grande affinité avec le récepteur et donc possède la majorité de l'activité biologique.

Les récepteurs thyroïdiens sont des membres de la grande famille des récepteurs hormonaux nucléaires. Deux gènes, localisés sur les chromosomes 17 (THRA) et 3 (THRB), codent respectivement pour les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR),  $TR\alpha$  et  $TR\beta$ .

Chaque gène, par épissage alternatif, donne naissance à différents isoformes du récepteur :  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  pour THRA ou  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 3$  pour THRB. Ils sont impliqués dans la plupart des effets de la  $T_3$  et sont liés à la chromatine même en absence de ligand (Greenspan and Gardner, 2001). Le récepteur est formé de trois parties : le domaine de liaison à l'ADN, le domaine de liaison au ligand et la région « Hinge », un domaine amino-terminal (Yen, 2001). Le récepteur a une très grande affinité pour le TRE, situé généralement en aval d'un gène cible. Les TR se lient en monomères, homodimères ou hétérodimères, le plus souvent avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR) pour l'hétérodimérisation. Cette hétérodimérisation facilite la liaison du TR au TRE (Sugawara et al., 1993).

Le TR inhibe les gènes positivement régulés par  $T_3$  en l'absence de cette dernière. Cette activité inhibitrice est induite par le domaine de liaison au ligand du TR, la liaison de l'hormone au TR annulant cette inhibition (Zhang et al., 1991). Cette liaison engendre des changements de conformation et l'hétérodimérisation avec le RXR sur le TRE, qui permet à la  $T_3$  de moduler l'activité transcriptionnelle. Dans la régulation du gène de la FAS, la  $T_3$  entraîne une augmentation de l'activité enzymatique de 3 fois, lorsqu'elle est seule. En présence d'insuline, l'augmentation observée varie de 9 à 14 fois. Il y aurait donc un effet synergique entre la  $T_3$  et l'insuline, la  $T_3$  ayant un effet inducteur plus efficace en présence d'insuline (Radenne et al., 2008, Wilson et al., 1986). La régulation de la transcription du gène de la FAS par  $T_3$  impliquerait un rôle important de la phosphorylation (Roncero and Goodridge, 1992b). Des travaux au laboratoire démontrent l'implication de l'action des sérine kinases (Radenne et al., 2008) et donc une action non génomique de la  $T_3$  (Radenne et al., 2008) dans la modulation de la transcription de gène. En effet, d'après Radenne et collègues (Radenne et al., 2008), il semblerait qu'un mécanisme de phosphorylation serait impliqué dans cette régulation du gène *FAS* par la  $T_3$ . Ce mécanisme semble être général aux gènes régulés par la  $T_3$ , vu qu'il est également observé lorsqu'on utilise un TRE synthétique, le DR4 (Radenne et al., 2008). Ce serait via un mécanisme d'action non-génomique au niveau du TRE par l'activation d'une cascade de signalisation PI3K-Erk1/2-MAPK (Radenne et al., 2008).

### **c. La régulation nutritionnelle**

#### **i. Régulation de la FAS par les glucides**

L'activité de la FAS augmente chez les sujets nourris normalement et diminue chez ceux à l'état de jeûne. Cette augmentation est en partie attribuable au glucose (Laux and Schweizer, 1990). En fait, le glucose augmente la transcription de nombreux gènes impliqués dans la lipogenèse telle que l'enzyme malique et la FAS (Katsurada et al., 1990). Les effets du glucose sont visibles au niveau de la transcription pour ces deux gènes (Hillgartner and Charron, 1998). Le glucose doit être tout d'abord phosphorylé en glucose 6-phosphate par la glucokinase (GK) pour avoir un effet inducteur (Foufelle et al., 1996).

L'action du glucose au niveau du promoteur est médié par les ChREBP (« carbohydrate responsive element binding protein ») qui reconnaissent la séquence « E box » située sur le promoteur du gène de la FAS. En l'absence de glucose, la ChREBP est phosphorylée et localisée dans le cytosol de la cellule. Sa translocation vers le noyau est induite suite à l'entrée de glucose dans la cellule, entraînant une déphosphorylation de la protéine. La protéine phosphatase 2A (PP2A) qui est responsable de cette déphosphorylation serait activée par le xylulose 5-phosphate (X5P), un métabolite du glucose généré par la voie glycolytique (Doiron et al., 1996).

#### **ii. Régulation de la FAS par les acides gras polyinsaturés**

Les acides gras ingérés dans l'alimentation ont un rôle inhibiteur sur la formation des lipides, particulièrement en modulant la transcription de plusieurs gènes de la lipogenèse. L'expression de l'ACC, l'enzyme malique, la FAS, la pyruvate kinase et la SCD-1 est diminuée de 60-90% par des diètes riches en acides gras polyinsaturés (PUFA) (Clarke and Jump, 1994). L'action des acides gras polyinsaturés se ferait par deux voies (*fig. 11*). La première voie, impliquant les facteurs de transcription PPAR (Peroxisome proliferator activated receptor), serait responsable de l'augmentation et de la répression de l'expression des gènes par une interaction avec le PPRE (peroxisome proliferator responsive element). L'autre voie, indépendante des PPAR, impliquerait un mécanisme de répression spécifique

aux PUFA. En effet une PUFA-BP (polyunsaturated fatty acid binding protein) se lierait à un élément de réponse aux acides gras polyinsaturés (PUFA-RE) situé sur les promoteurs de ces gènes (Sessler and Ntambi, 1998).

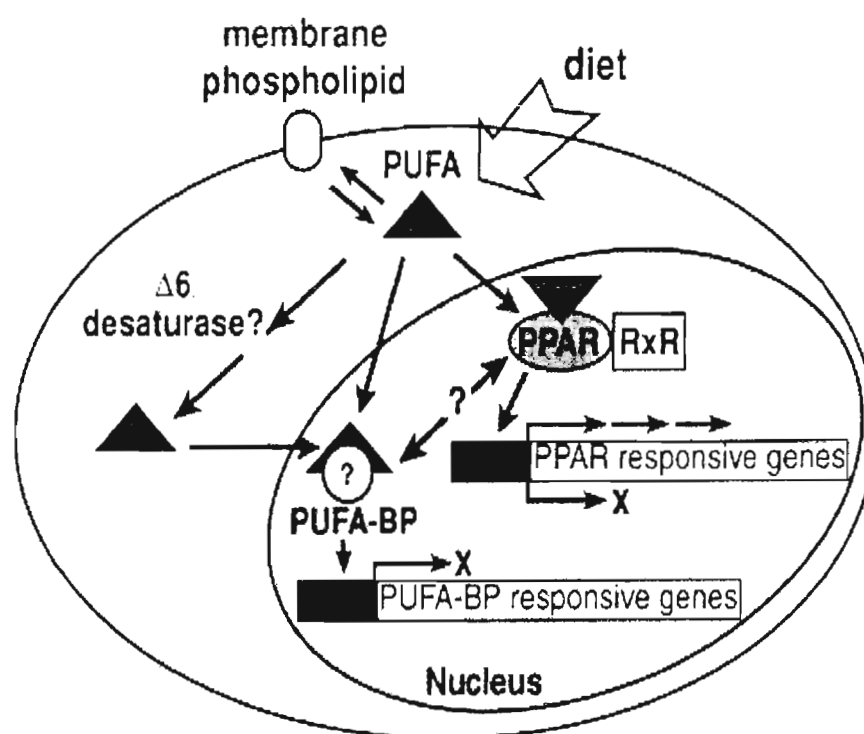


Figure 11 : Mécanismes de régulation transcriptionnelle des gènes par les acides gras polyinsaturés dépendante et indépendante des PPAR- (Sessler and Ntambi, 1998). PUFA : Acides gras polyinsaturés ; RXR : Récepteur à l'acide rétinoïque, PPRE : élément de réponse de prolifération du peroxyssome ; PUFA-RE : Elément de réponse aux PUFA

### iii. Régulation de la FAS par les acides gras à chaîne moyenne

Le mécanisme d'inhibition de la FAS par les acides gras à chaîne moyenne (MCFA) reste encore inconnu et c'est en partie le but de notre étude. Il a été cependant montré que les MCFA ont un rôle physiologique et que leur présence inhibe spécifiquement l'augmentation synergique de l'activité de la FAS induite par l'insuline et la  $T_3$  (Sawadogo, 2006). L'inhibition de l'activité de l'enzyme par ces agents est en effet sélective et spécifique, vu qu'ils n'inhibent en rien la transcription de la  $\beta$ -actine et que des acides gras à chaîne plus longue ou plus courte n'auraient aucun effet (Roncero and Goodridge, 1992a). L'hexanoate et l'octanoate inhibent la transcription du gène FAS dans les CEH dès 30 minutes (Roncero

and Goodridge, 1992a). Cette inhibition de la transcription, médiée par les MCFA, semble avoir lieu au niveau du TRE, en ce qui concerne l'enzyme malique, une autre enzyme de la lipogenèse (Thurmond et al., 1998). Cependant, les MCFA ne semblent pas moduler la fixation de l'hormone sur son récepteur, ni du TR sur le TRE (Thurmond et al., 1998, Roncero and Goodridge, 1992a). Il a été suggéré que l'inhibiteur actif est un dérivé des MCFA mais son identité reste à confirmer (Roncero and Goodridge, 1992a).

Différentes hypothèses peuvent être émises quand au mécanisme de régulation de FAS par la  $T_3$ . Les MCFA ou plus probablement leurs métabolites moduleraient la maturation de SREBP-1, entraînant ainsi une inhibition de la transcription induite par la  $T_3$  et l'insuline (Zhang et al., 1991). Une autre hypothèse serait que ces acides gras agiraient par leur fixation sur un récepteur de type GPCR (G protein coupled receptor) (Brown et al., 2005a) et donc activeraient différentes cascades de signalisation pouvant moduler le niveau de phosphorylation ou d'acétylation du complexe TR/RXR ou des différents co-activateurs ou corépresseurs (Yen, 2001).

## **RÉSULTATS**

## RÉSULTATS

### I. Rôle de l'hexanoate dans l'inhibition de l'activité de la FAS

*Cet article a été soumis dans Lipides en 2008. Il a été refusé et des expériences complémentaires sont en cours. Il devrait être resoumis à Lipides sous peu.*

En tant que premier auteur j'ai effectué la majeure partie des expériences et a écrit le manuscrit. Le second auteur a fait plusieurs expériences sur l'activité enzymatique, sur la captation et le profile lipidique. J'ai par la suite répété la plupart de ces expériences afin de permettre des analyses statistiques valables. Le troisième auteur réalise les expériences complémentaires afin de resoumettre l'article et le dernier auteur est le directeur de recherche.

1. Article :

#### INHIBITION OF INSULIN/T3-INDUCED FATTY ACID SYNTHASE ACTIVITY BY ACYL-CoA HEXANOATE.

**Abbreviation title:** Inhibition of FAS by C<sub>6</sub>.

*Murielle M. Akpa, Sabine Sawadogo, Anne Radenne and Catherine Mounier\*.*

Département des Sciences Biologiques, Centre de recherche BioMed, Université du Québec,  
Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8.

**Correspondent footnote.** \*To whom correspondence should be addressed: Département des Sciences Biologiques, Centre de recherche BioMed, Université du Québec. C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Canada, H3C 3P8. Tel: 1-514-987-3000, Ext. 8912; Fax: 1-514-987-4647; E-mail: [mounier.catherine@uqam.ca](mailto:mounier.catherine@uqam.ca)



**ABSTRACT** – Fatty acid synthase is responsible for the *de novo* synthesis of palmitate and stearate. This enzyme is activated by insulin and  $T_3$  and inhibited by fatty acids. In this study, we show that insulin and  $T_3$  have an inducing effect on FAS enzymatic activity, which is synergetic when both hormones are present. Octanoate and hexanoate specifically inhibit this hormonal effect. Using bromo-hexanoate, we determined that  $C_6$  needs to be transformed to act. Incubation of cells with triglyceride-hexanoate or carnitine-hexanoate does not affect insulin and  $T_3$ -induced FAS enzymatic activity. The same result was obtained when cells were incubated with betulinic acid, an inhibitor of the diacylglycerol acyltransferase. However, the incubation of cells with Triacsin C, a general inhibitor of acyl-CoA synthetases completely reversed the inhibitory effect of hexanoate. This suggests that an acyl-CoA derivative of hexanoate inhibits the insulin and  $T_3$ -induced FAS activity.

## INTRODUCTION

Lipogenesis, in humans as in birds, takes place mainly in the liver [1]. Fatty acid synthase (FAS) (EC.2.3.1.85) is a key enzyme of lipogenesis, and is expressed mainly in the liver. In the presence of NADPH, this multifunctional enzymatic complex is responsible for the production of palmitate from acetyl-CoA and malonyl-CoA [2]. The activity of hepatic FAS, as most lipogenic enzymes [3], is regulated through nutrients and hormones. Starvation causes decrease in FAS enzymatic activity and transcription while refeeding restores it [4, 5]. In fact, insulin [6] and triiodothyronine ( $T_3$ ) [3, 7] will stimulate its activity, whereas medium chain fatty acids (MCFA) decrease it [8]. Insulin increases FAS activity by enhancing transcription through the modification of transcription factors' binding on the insulin response element (IRE) located on the promoter [6]. We recently demonstrated that insulin is also able to modulate FAS transcription through a specific  $T_3$  response element (TRE) [9].  $T_3$  regulates FAS through a direct genomic action on the TRE but also *via* a non genomic action involving the activation of a PI3-kinase-ERK1/2 MAPK signaling pathway [9]. MCFAs inhibit FAS activity by a still unknown mechanism but their effect also appears to be transcriptional [8]. The inhibition of FAS through MCFA is selective and specific, since they do not inhibit  $\beta$ -actin transcription and the longer or shorter fatty acids have no effect [8]. In the present study, we have shown in chick embryo hepatocytes (CEH), that hexanoate and octanoate specifically inhibit insulin and  $T_3$ -induced FAS activity. This  $C_6$  is rapidly taken up by the cells and mainly metabolized in triglycerides and cholesterol esters. Using specific inhibitors of MCFA metabolism, it appears that the acyl-CoA hexanoate, is directly responsible for the inhibition of the insulin and  $T_3$ -induced FAS activity.

## MATERIALS AND METHODS

*Materials* – Eggs from white Leghorn chickens were purchased from Couvoir Simentin (Mirabel, Quebec). Waymouth medium, T<sub>3</sub>, insulin, hexanoate, octanoate, Etomoxir, Betulinic acid, acetyl-CoA, malonyl-CoA, NADPH, sodium [<sup>14</sup>C]-hexanoate were obtained from Sigma Aldrich (Saint Louis, Missouri). Triacsin C was obtained from Biomol Research Laboratories (Cedarlane Laboratories, Hornby, ON). Collagenase H was obtained from Roche Diagnostic (Laval, Quebec). Unless otherwise specified in the text, all other chemicals were purchased from Sigma.

*Cell Culture* – Chick embryo hepatocytes (CEH) were isolated from livers of 19-day-old chick embryos [1] (protocol # 590 approved by the University animal care comity). 2.5 x 10<sup>6</sup> cells were plated in 35 mm dishes and cultured at 40°C under 5% CO<sub>2</sub> in Waymouth medium supplemented with streptomycin and penicillin. After 24 h, the medium was removed by aspiration and replaced by medium supplemented with 1.6 µM of T<sub>3</sub> and/or 100 nM of insulin, and incubated for an additional 24h. The incubation was also performed in presence of 1 µM MCFA (hexanoate or octanoate), triglycerides-hexanoate or carnitine-hexanoate. The triglycerides were coupled to bovine serum albumin (BSA) at a 1 to 4 ratio in order to facilitate their entry into the cell [10]. The experiments using radio-labeled compounds were performed with [<sup>14</sup>C]-hexanoate that was added to the medium after a pre-incubation of 24h with the various hormones, for either 1h or 24 h. For the experiments using inhibitors, the CEH were pre-incubated for 30 minutes with either DMSO 0.5%, 1 µM Etomoxir, 1 µM Betulinic acid or 5 µM Triacsin C, followed by the hormonal treatment for 24 h.

*FAS activity* – As previously described, FAS activity was measured by tracking the decrease of absorbance at 340 nm as a result of NADPH disappearance due to the conversion of malonyl-CoA and acetyl-CoA into long chain fatty acids [11].

*Fatty acid uptake* – CEH were incubated in serum free Waymouth medium supplemented with hormones, inhibitors and [<sup>14</sup>C]-hexanoate for 24 h as indicated on the figure legends. The uptake was stopped with a pre-heated solution containing 0.5% BSA prepared in 1X PBS and 0.9% NaCl. The cells were then stripped and lysed in 0.1 M NaOH overnight at 4°C. Cells lysates were counted by β-scintillation with the Liquid scintillation analyzer Tri-carb 2800 TR (Perkin Elmer, Quebec).

*Lipid Profile* – CEH were incubated in serum free Waymouth medium supplemented with hormones, inhibitors and [ $^{14}\text{C}$ ]-hexanoate for 24 h as indicated on the figure legends. The uptake was stopped with 0.2% BSA in PBS. The lipids were extracted from the cells for 1 h in a hexane: isopropanol mix (3:2, v/v). The lysates were subsequently evaporated under nitrogen and re-suspended in 50  $\mu\text{L}$  of chloroform. The samples and standards (cholesterol and cholesteryl oleate) are then migrated on a TLC silicate plate in a solution containing petroleum ether, anhydrous ether and glacial acetic acid (90:10:1), and revealed in an iodide saturated chamber. The strips were then cut read by scintillation using the Liquid scintillation analyzer Tri-carb 2800 TR (Perkin Elmer, Quebec).

## RESULTS

### *Role of insulin, T<sub>3</sub> and MCFAs on FAS enzymatic activity*

Various studies have already demonstrated that in liver T<sub>3</sub> and insulin are able to increase FAS enzymatic activity and expression [3, 9, 12, 13]. Incubation of the CEH with 100 nM insulin or 1.6  $\mu$ M T<sub>3</sub> increases FAS activity by about 3 fold and in presence of both hormones, an important synergistic effect is observed (14 fold, Fig. 1A). Similar hormonal effects are observed measuring the promoter activity demonstrating that this regulation is transcriptional [9]. Addition of 1  $\mu$ M hexanoate or octanoate does not modify basal, insulin or T<sub>3</sub>-induced FAS enzymatic activity. When MCFAs were used in concordance with insulin and T<sub>3</sub>, they had an inhibitory effect on FAS enzymatic activity of about half (Fig. 1B and C). The inhibition was even more effective when hexanoate was used (50%) compared to the effect of octanoate (40%). Therefore, in the rest of our study, we have focused on the effect of hexanoate.

### *Effect of hormonal treatment of hexanoate uptake*

Our previous data demonstrated that C<sub>6</sub> only inhibits FAS enzymatic activity in presence of both insulin and T<sub>3</sub>. However, we could not exclude that in absence of both hormones, the MCFA may not efficiently penetrates into the cell. In order to evaluate this hypothesis, we measured the uptake of [<sup>14</sup>C]-hexanoate in each hormonal condition. In absence of any hormonal treatment, C<sub>6</sub> efficiently enters the cell, however this uptake is significantly increased by the presence of either insulin, T<sub>3</sub> or both hormones (Fig. 2A). We have to note that regardless of the hormonal treatment used, the [<sup>14</sup>C]-hexanoate was able to enter the cell unhindered and this in a very short time. After only 1 h, the levels of [<sup>14</sup>C]-hexanoate found in the cells are comparable to those found in cells exposed for 24 h.

### *Pretranslational effect of hexanoate on FAS enzymatic activity*

The literature shows that FAS is mainly regulated at the transcriptional level [8]. In addition, Goodridge and collaborators had suggested that MCFAs may down regulate malic enzyme activity through an inhibition of transcription [8, 14]. Therefore, we evaluated at which level the hexanoate was acting to inhibit FAS activity. For this, we added the MCFA to the reaction buffer just before measuring the enzymatic activity. As depicted in Fig. 2B, the hexanoate needs to be present in the cell in order to efficiently inhibit the insulin and T<sub>3</sub>-induced FAS activity (Fig. 2B) while the presence of C<sub>6</sub> in the reaction buffer has little or no

effect. In agreement with previous data, our results suggest that the MCFA modulates the level of FAS expression, probably by modulating the transcription and has no allosteric effect.

#### *Effect of MCFAs metabolites on FAS enzymatic activity*

As MCFAs taken up by the cells are rapidly metabolized [15], we analyzed the cellular lipid profile after incubation of cells for 24 h with [ $^{14}$ C]-hexanoate. As depicted in table 1, we show that about 60% of hexanoate that enters into the cells nevertheless ends up in the triacylglycerol fraction. The presence of both insulin and  $T_3$  even increases it to almost 66%. The rest of the MCFAs end up into cholesterol ester (around 25%) and phospholipids (around 10%). However, the presence of the two hormones decreases this conversion orienting the MCFA towards the esterification pathway. These results may suggest that the glycerol-hexanoate was to have the same effect on FAS enzymatic activity as  $C_6$ .

Subsequently, we devised a strategy that should enable us to determine if hexanoate really needs to be modified in order to inhibit FAS enzymatic activity (Fig. 3A). In Fig. 3B, we observed that bromo-hexanoate, a form of hexanoate that cannot be metabolized, has no inhibitory effect on insulin and  $T_3$ -induced FAS enzymatic activity, thus suggesting the implication of a metabolite. Incubation of cells with either glycerol-hexanoate (Fig. 3C) or carnitine-hexanoate (Fig. 3D) does not reveal any inhibition of FAS enzymatic activity. Taken together, our results suggest that even if after 24 h the MCFA is mainly metabolized in triglycerides, it does not appear to be esterified or  $\beta$ -oxidized in order to modulate FAS enzymatic activity.

#### *Role of the inhibitors of fatty acids metabolism on the effect of hexanoate*

In order to validate our previous data, we used specific pharmaceutical inhibitors to evaluate the role of each different lipid metabolic pathways. In Fig. 4A, we observed that the inhibitory effect of hexanoate on insulin and  $T_3$ -induced FAS enzymatic activity remained even when the cells were treated with Etomoxir, an inhibitor of the carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1). The same is true in Fig. 4B, when the cells are treated with betulinic acid, a specific inhibitor of the diacylglycerol transferase (DGAT). We have to note that the presence of these inhibitors does not affect the  $C_6$  uptake (Fig. 4D, *crossed bars*). These results confirm our previous observations suggesting that hexanoate is not transformed into TG-hexanoate or carnitine-hexanoate in order to inhibit FAS enzymatic activity. The use of

bromo-hexanoate demonstrates that  $C_6$  needs however to be metabolized. It was previously demonstrated that as soon as the MCFA enters into the cell, it is rapidly transformed into an acyl-CoA derivative, reaction catalyzed by the octanoyl-CoA synthase [16]. In order to test that hypothesis, we evaluated the effect of Triacsin C, a general inhibitor of acyl-CoA synthases [17], on the inhibitory effect of hexanoate. Under those conditions, we saw a total abolition of the inhibitory effect induced by hexanoate, and recuperated the synergistic effect seen when the cells are stimulated with insulin and  $T_3$  (Fig. 4C). As observed for Etomoxir and betulinic Acid, the Triacsin C has no effect on  $C_6$  uptake (Fig. 4D, *crossed bars*). Taken together, our results suggest that in CEH,  $C_6$  needs to be converted into an acyl-CoA derivative in order to inhibit insulin and  $T_3$ -induced FAS enzymatic activity.

## DISCUSSION

Previous studies have shown that FAS is inhibited by MCFAs, such as hexanoate and octanoate [8]. We and others have observed that hexanoate and octanoate, but not decanoate nor butanoate (*data not shown*, [8]), can inhibit FAS enzymatic activity by half, but only in the presence of insulin and  $T_3$ . This inhibition is very specific to those two fatty acids, and even more pronounced with hexanoate (about 50%) than with octanoate (about 40%) (Figs. 1B and C). In addition, the inhibitory effect of hexanoate appears to be selective of lipogenic genes, at least to FAS and malic enzyme, because DNA content and transcription of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes were not inhibited [8].

It appears that hexanoate mediates its inhibition of the lipogenic genes at transcription rates and did so within 30 min of addition [8]. This was confirmed by our experiment showing that MCFA inhibition was not an allosteric competition and that hexanoate was able to enter the cell unhindered after just one hour.

The mechanism of MCFA action is still unknown. However, hexanoate appears to target the  $T_3$  response element (TRE) on the malic enzyme promoter [14]. This fatty acid does neither modify the binding of  $T_3$  on its nuclear receptor TR nor modify the TR binding on the TRE [14]. MCFAs may act on a GPCR activating downstream signaling cascades [18], leading to the phosphorylation of transcription factors bound on the TRE [19]. However, this hypothesis is unlikely as bromo-hexanoate has no effect on insulin and  $T_3$ -induced FAS activity (Fig. 3B). The MCFAs may also modulate the maturation of the SREBP-1c transcription factor [20] influencing the effect of insulin and  $T_3$  on FAS expression. However, this latter hypothesis remains to be elucidated.

Our data show that the MCFA enter rapidly into the cell. It is well established that MCFA uptake occurs by simple diffusion without any implication of specific transporters [21, 22]. It is rapidly transformed into an acyl-CoA derivative through the action of a specific octanoyl-CoA synthase [16]. This acylation occurred in the mitochondria as the MCFAs crosses the double mitochondrial membrane very rapidly and, unlike long-chain fatty acids, they do not require the presence of carnitine palmityl transferase [23]. This is in agreement with the fact that neither carnitine-hexanoate nor Etomoxir (inhibitor of CTPI) affect insulin and  $T_3$ -induced FAS enzymatic activity.



The MCFA-CoA derivative can be transformed into ketone bodies through the  $\beta$ -oxydation pathway. However, in CEH, this does not appear to be the case as most of the [ $^{14}\text{C}$ ]-hexanoate taken up by the cells are found in the triglyceride fraction (more than 60%; Table I). Therefore, most of the acyl-CoA hexanoate must be transformed into acetyl-CoA, becoming a carbone source for *de novo* lipid synthesis ending in the formation of new triglycerides [23]. This appears to be supported by the fact that in presence of insulin and  $\text{T}_3$ , the amount of [ $^{14}\text{C}$ ]-TG is increased compared to the level measured in absence of any hormonal stimulation (Table I). Indeed, it is well known that insulin stimulates the hepatic triacylglycerol secretion through the general activation of *de novo* lipid synthesis [24]. It is also well established that  $\text{T}_3$  stimulates *de novo* lipid synthesis in liver ending up in increasing synthesis of TG [25, 26].

The use of betulinic acid, an inhibitor of DGAT, a rate limiting step in the esterification pathway (Fig. 4B) or the incubation of cells with TG-hexanoate (Fig. 3C) did not reveal any abolition of the inhibitory effect of hexanoate on FAS activity. The incubation of cells with Triacsin C, a general inhibitor of acyl-CoA synthases [17] completely reversed the inhibitory effect of hexanoate on FAS activity. Therefore, our data strongly suggest that only the Acyl-CoA-hexanoate, is able to modulate the FAS enzymatic activity. This is also in agreement with the fact that hexanoate can modulate FAS transcription after only 30 min of incubation [8].

In conclusion, in the present study we have shown that hexanoate is rapidly taken up by CEH. It is subsequently metabolized into an acyl-CoA derivative that can specifically inhibit insulin and  $\text{T}_3$ -induced FAS activity.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from NSERC.

## REFERENCES

- [1] A.G. Goodridge, Regulation of fatty acid synthesis in isolated hepatocytes. Evidence for a physiological role for long chain fatty acyl coenzyme A and citrate, *J Biol Chem* 248 (1973) 4318-4326.
- [2] S.J. Wakil, Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme, *Biochemistry* 28 (1989) 4523-4530.
- [3] S.B. Wilson, Back, D. W., Morris, S. M., Jr., Swierczynski, J., Goodridge, A. G., Hormonal regulation of lipogenic enzymes in chick embryo hepatocytes in culture. Expression of the fatty acid synthase gene is regulated at both translational and pretranslational steps, *J Biol Chem* 261 (1986) 15179-15182.
- [4] D.W. Back, S.B. Wilson, S.M. Morris, Jr., A.G. Goodridge, Hormonal regulation of lipogenic enzymes in chick embryo hepatocytes in culture. Thyroid hormone and glucagon regulate malic enzyme mRNA level at post-transcriptional steps, *J Biol Chem* 261 (1986) 12555-12561.
- [5] S.M. Morris, Jr., L.K. Winberry, J.E. Fisch, D.W. Back, A.G. Goodridge, Developmental and nutritional regulation of the messenger RNAs for fatty acid synthase, malic enzyme and albumin in the livers of embryonic and newly-hatched chicks, *Mol Cell Biochem* 64 (1984) 63-68.
- [6] J.D. Paulauskis, H.S. Sul, Hormonal regulation of mouse fatty acid synthase gene transcription in liver, *J Biol Chem* 264 (1989) 574-577.
- [7] S.R. Stapleton, D.A. Mitchell, L.M. Salati, A.G. Goodridge, Triiodothyronine stimulates transcription of the fatty acid synthase gene in chick embryo hepatocytes in culture. Insulin and insulin-like growth factor amplify that effect, *J Biol Chem* 265 (1990) 18442-18446.
- [8] C. Roncero, A.G. Goodridge, Hexanoate and octanoate inhibit transcription of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture, *J Biol Chem* 267 (1992) 14918-14927.
- [9] A. Radenne, M. Akpa, C. Martel, S. Sawadogo, D. Mauvoisin, C. Mounier, Hepatic Regulation of Fatty Acid Synthase by Insulin and T3: Evidence for T3 genomic and non genomic actions., *American Journal of Physiology: Endocrinology and metabolism* In Press. (2008).

- [10] W.E. Kuhl, A.A. Spector, Uptake of long-chain fatty acid methyl esters by mammalian cells, *J Lipid Res* 11 (1970) 458-465.
- [11] A.G. Goodridge, Regulation of the activity of acetyl coenzyme A carboxylase by palmitoyl coenzyme A and citrate, *J Biol Chem* 247 (1972) 6946-6952.
- [12] H.S. Sul, D. Wang, Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription, *Annu Rev Nutr* 18 (1998) 331-351.
- [13] J. Swierczynski, D.A. Mitchell, D.S. Reinhold, L.M. Salati, S.R. Stapleton, S.A. Klautky, A.E. Struve, A.G. Goodridge, Triiodothyronine-induced accumulations of malic enzyme, fatty acid synthase, acetyl-coenzyme A carboxylase, and their mRNAs are blocked by protein kinase inhibitors. Transcription is the affected step, *J Biol Chem* 266 (1991) 17459-17466.
- [14] D.C. Thurmond, R.A. Baillie, A.G. Goodridge, Regulation of the action of steroid/thyroid hormone receptors by medium-chain fatty acids, *J Biol Chem* 273 (1998) 15373-15381.
- [15] T. Aoyama, N. Nosaka, M. Kasai, Research on the nutritional characteristics of medium-chain fatty acids, *J Med Invest* 54 (2007) 385-388.
- [16] A.C. Bach, V.K. Babayan, Medium-chain triglycerides: an update, *Am J Clin Nutr* 36 (1982) 950-962.
- [17] M.S. Gauthier, H. Miyoshi, S.C. Souza, J.M. Cacicedo, A.K. Saha, A.S. Greenberg, N.B. Ruderman, AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance, *J Biol Chem* 283 (2008) 16514-16524.
- [18] A.J. Brown, S. Jupe, C.P. Briscoe, A family of fatty acid binding receptors, *DNA Cell Biol* 24 (2005) 54-61.
- [19] P.M. Yen, Physiological and molecular basis of thyroid hormone action, *Physiol Rev* 81 (2001) 1097-1142.
- [20] Y. Zhang, L. Yin, F.B. Hillgartner, SREBP-1 integrates the actions of thyroid hormone, insulin, cAMP, and medium-chain fatty acids on ACC $\alpha$  transcription in hepatocytes, *J Lipid Res* 44 (2003) 356-368.

- [21] J.A. Hamilton, F. Kamp, How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids?, *Diabetes* 48 (1999) 2255-2269.
- [22] F. Kamp, J.A. Hamilton, How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75 (2006) 149-159.
- [23] J. Bremer, Carnitine and its role in fatty acid metabolism, *Trends Biochem. Sci.* 2 (1980) 207-209.
- [24] V.A. Zammit, Insulin stimulation of hepatic triacylglycerol secretion in the insulin-replete state: implications for the etiology of peripheral insulin resistance, *Ann N Y Acad Sci* 967 (2002) 52-65.
- [25] S. Dayton, J. Dayton, F. Drimmer, F.E. Kendall, Rates of acetate turnover and lipid synthesis in normal, hypothyroid and hyperthyroid rats, *Am J Physiol* 199 (1960) 71-76.
- [26] S. Diamant, E. Gorin, E. Shafrir, Enzyme activities related to fatty-acid synthesis in liver and adipose tissue of rats treated with triiodothyronine, *Eur J Biochem* 26 (1972) 553-559.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Effect of MCFA on FAS enzymatic activity.** The CEH were incubated for 24 h in Waymouth media (*white bars*), in presence of either 100 nM insulin (*grey bars*), 1.6  $\mu$ M T<sub>3</sub> (*hatched bars*) or with both hormones (*black bars*). FAS activity was evaluated as indicated in Materials and Methods. **A-** Results represent FAS activities and are the mean of at least 3 independent experiments. They are expressed in function of the value obtained in untreated samples. The bars indicate the standard deviation (SD). \*  $p < 0.001$  for insulin or T<sub>3</sub> treated *versus* untreated cells. Cells were treated as described above except that 1  $\mu$ M of hexanoate (**B**) or octanoate (**C**) was added to the media. Results represent FAS activities expressed as fold induction measured in presence of the MCFA (FAS activity measured in presence of the MCFA divided by the activity measured in absence of MCFA). Results are the mean of 3 independent experiments. The bars indicate the SD. §  $p < 0.01$  for Insulin, T<sub>3</sub> and MCFA treated *versus* either insulin or T<sub>3</sub> treated cells.

**Figure 2: Effect of hormonal treatment on hexanoate uptake.** **A-** The CEH were incubated for either 1h (*white bars*) or 24 h (*black bars*) in presence or not of 100 nM insulin, 1.6  $\mu$ M T<sub>3</sub> or with both hormones. In each condition, 1  $\mu$ Ci of [<sup>14</sup>C]-hexanoate was also added. The C<sub>6</sub> uptake was evaluated as indicated in Materials and Methods. Results are expressed in cpm per  $\mu$ g of proteins and are the mean of 3 independent experiments. The bars indicate the SD. \*  $p < 0.05$  for insulin and/or T<sub>3</sub> treated *versus* untreated cells. **B-** FAS activity was measured as described in Material and Methods, using cell lysate from untreated (*white bars*) or treated with 100 nM insulin and 1.6  $\mu$ M T<sub>3</sub>-treated cells for 24 h (*black bars*) with addition of 1  $\mu$ M hexanoate in the media (*crossed bar*) or in the enzymatic reaction buffer (*hatched bar*).

**Figure 3: Effects of the hexanoate metabolites on FAS enzymatic activity.** **A-** Schematic representation of C<sub>6</sub> metabolism in CEH cells. CEH were incubated for 24 h in Waymouth media (*white bars*) or with addition of 100 nM insulin and 1.6  $\mu$ M T<sub>3</sub> (*black bars*) supplemented with 1  $\mu$ M of hexanoate (*hatched bars*). The effect of 1  $\mu$ M bromo-hexanoate (**B**), 1  $\mu$ M TG-hexanoate (**C**) or 1  $\mu$ M carnitine-hexanoate (**D**) (*crossed bars*) was also

evaluated. FAS activity was evaluated as indicated in Materials and Methods. Results are the mean of at least 3 independent experiments and are expressed in function of the value obtained in untreated samples. The bars indicate the SD.

**Figure 4: Effects of lipid metabolic pathways' inhibitors on FAS activity and C6 uptake.**

The CEH were incubated for 24 h in Waymouth media (*white bars*) or with addition of 100 nM insulin and 1.6  $\mu$ M T<sub>3</sub> (*black bars*) in presence or not of hexanoate (*hatched bars*). The effects of A- 1  $\mu$ M Etomoxir, B- 1  $\mu$ M Betulinic acid and C- 5  $\mu$ M Triascin C (*crossed bars*) on C6 inhibition were also tested. For B and C, 5 % of DMSO was added to each treatment. FAS activity was evaluated as indicated in Materials and Methods. Results are the mean of at least 3 independent experiments and are expressed in function of the value obtained in untreated samples. The bars indicate SD. \* p=0.0065 compared to Insulin/T<sub>3</sub>/C<sub>6</sub> treated cells. D- CEH were incubated for 24 h with 1  $\mu$ Ci of [<sup>14</sup>C]-hexanoate (*white bars*) and in presence of 100 nM insulin and 1.6  $\mu$ M T<sub>3</sub> (*black bars*). DMSO was added as indicated in the figure. In addition, 1  $\mu$ M Etomoxir, 1  $\mu$ M Betulinic acid or 5  $\mu$ M Triascin C were added (*crossed bars*) and the C<sub>6</sub> uptake was evaluated as indicated in Materials and Methods. Results are expressed in absolute values and are the mean of 3 independent experiments. The bars indicate the SD.

Figure 1

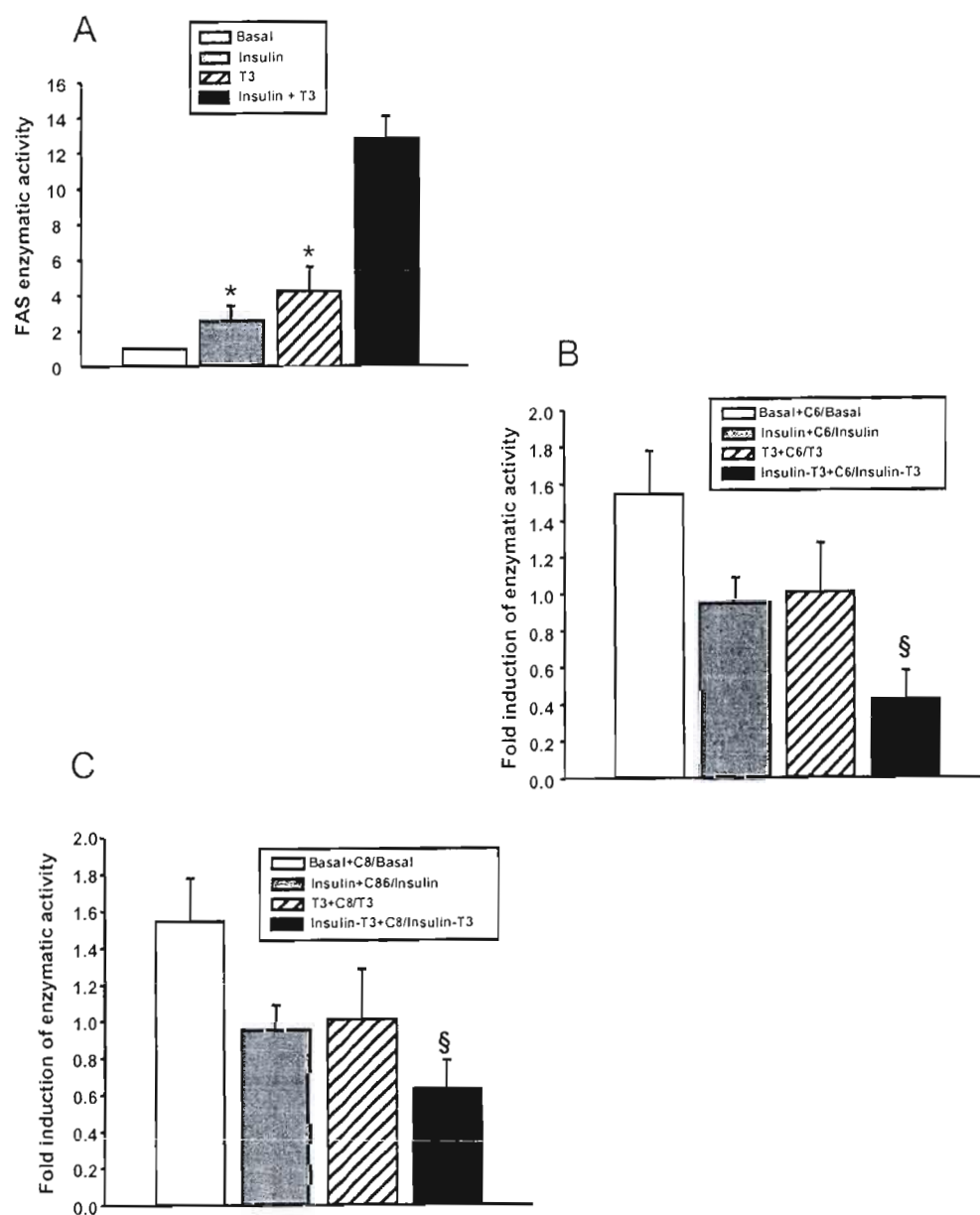


Figure 2

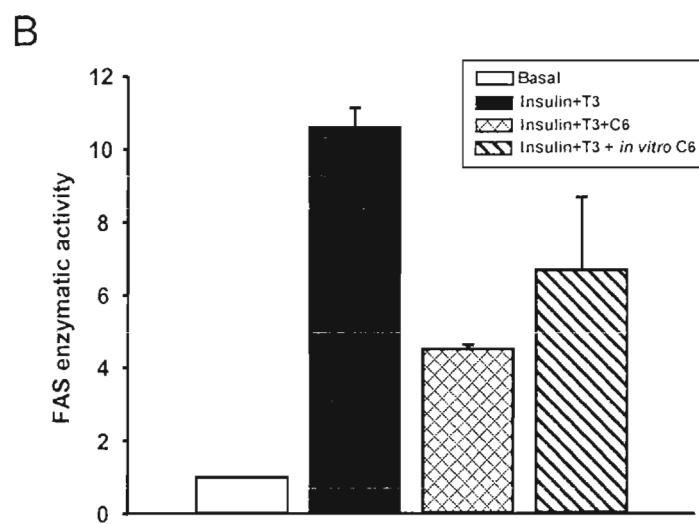
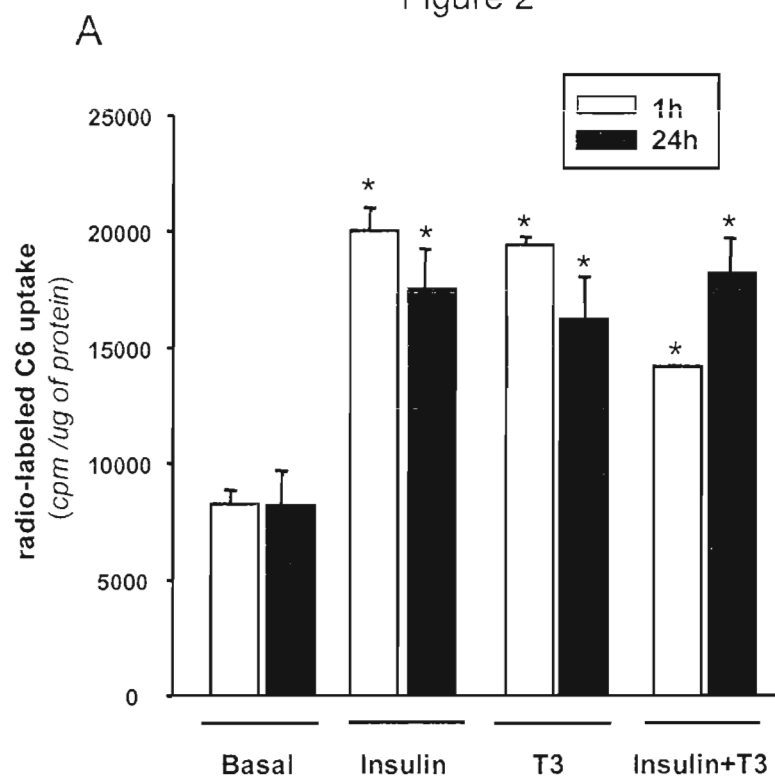




Figure 3

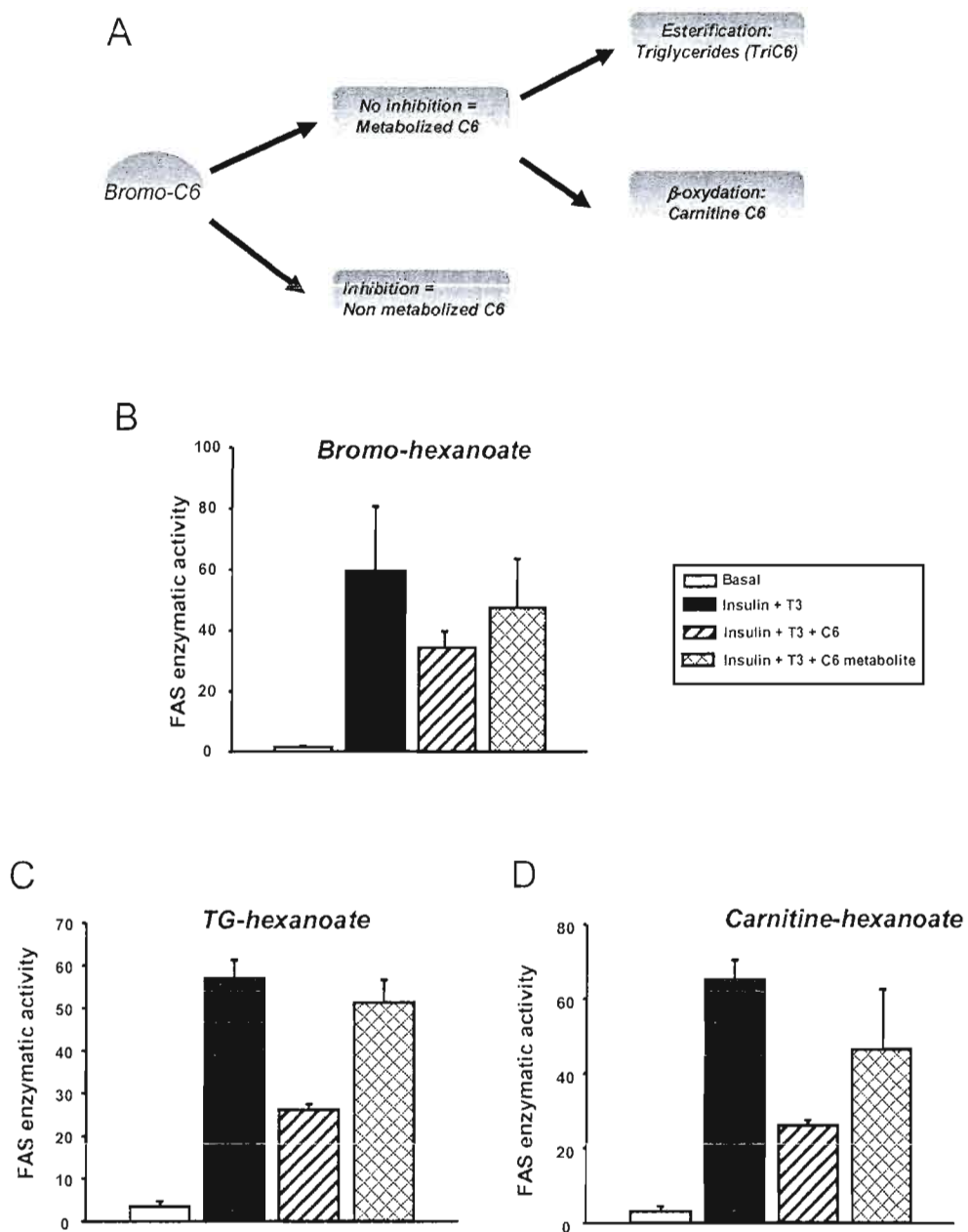
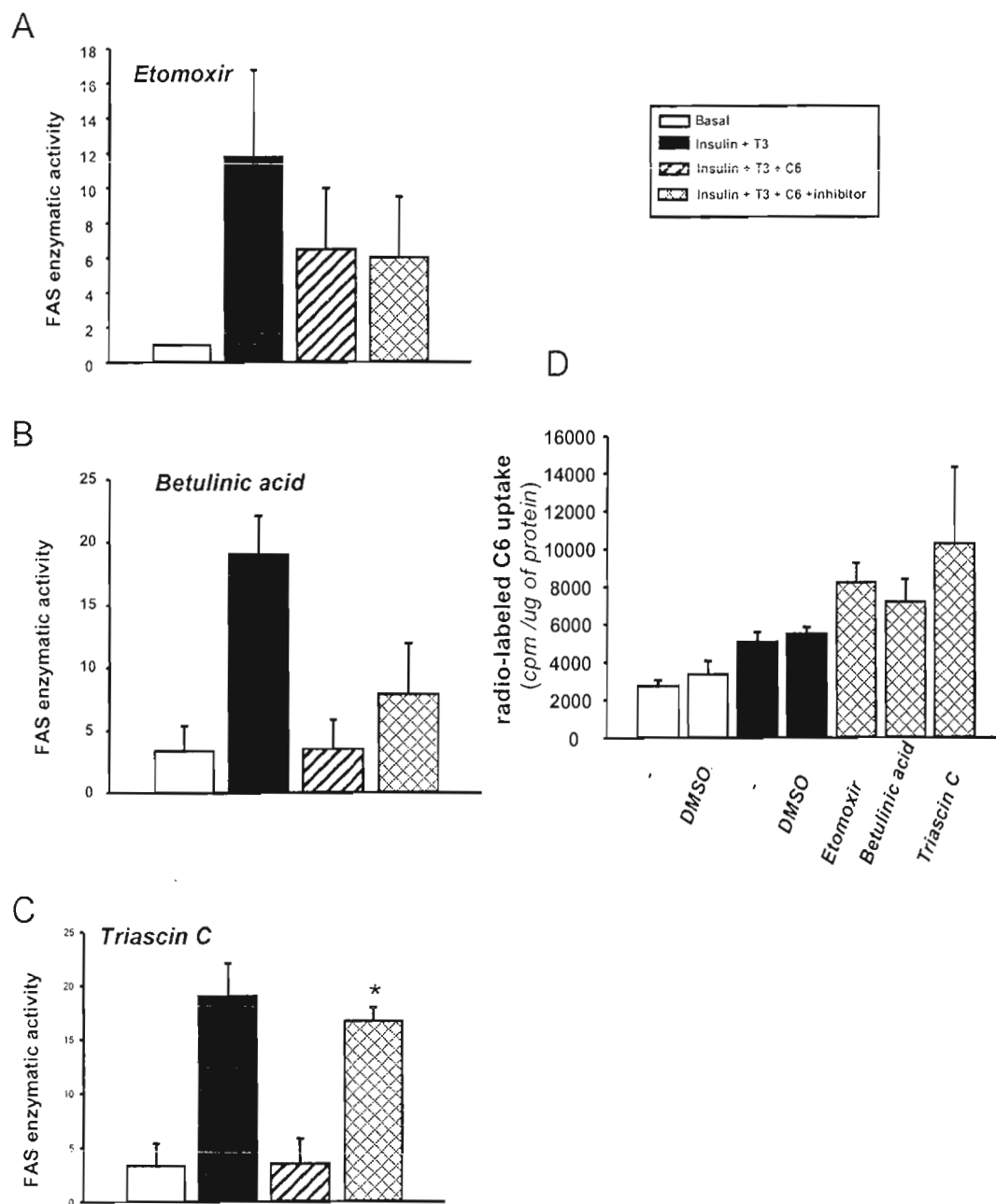


Figure 4



	Basal	Insulin	T3	Insulin + T3
Phospholipids	11.6 ± 7.2	10.4 ± 5.0	12.2 ± 8.6	7.5 ± 3.2
Free Cholesterol	1.0 ± 0.9	0.9 ± 0.8	0.9 ± 0.5	0.5 ± 0.3
Diacylglycerol	7.1 ± 3.2	4.5 ± 2.1	8.7 ± 5.6	5.0 ± 2.3
Triacylglycerol	55.7 ± 8.8	58.0 ± 7.4	50.8 ± 14.8	65.6 ± 3.0
Cholesterol ester	24.6 ± 4.0	26.2 ± 5.1	27.4 ± 5.6	21.4 ± 4.3

**Table 1: CEH lipid profile when submitted to hormonal stimulations in presence of radio-labeled hexanoic acid.** Cells were incubated for 24 h with hexanoate, insulin and/or T3. The lipid profile was revealed using TLC as indicated in the Materials and Methods section. Results are expressed as percentage of the total radioactive content. Data are the mean of three independent experiments, ± the standard deviation.

## 2. Résumé des résultats de l'article

Le besoin d'ATP noté dans les expériences réalisées antérieurement au laboratoire (Sawadogo, 2006), serait donc probablement dû à l'acylation des MCFA qui se produit au niveau de la membrane dès leur entrée dans la cellule. Il semblerait qu'un mécanisme d'acylation soit une étape nécessaire pour un acide gras à chaîne moyenne avant d'emprunter une voie métabolique, que ce soit l'estérification ou la  $\beta$ -oxydation. Ceci a d'ailleurs déjà été suggéré par l'équipe de Bach et Babayan (Bach and Babayan, 1982).

## II. Rôle de la phosphorylation sur la régulation de l'activité de la FAS

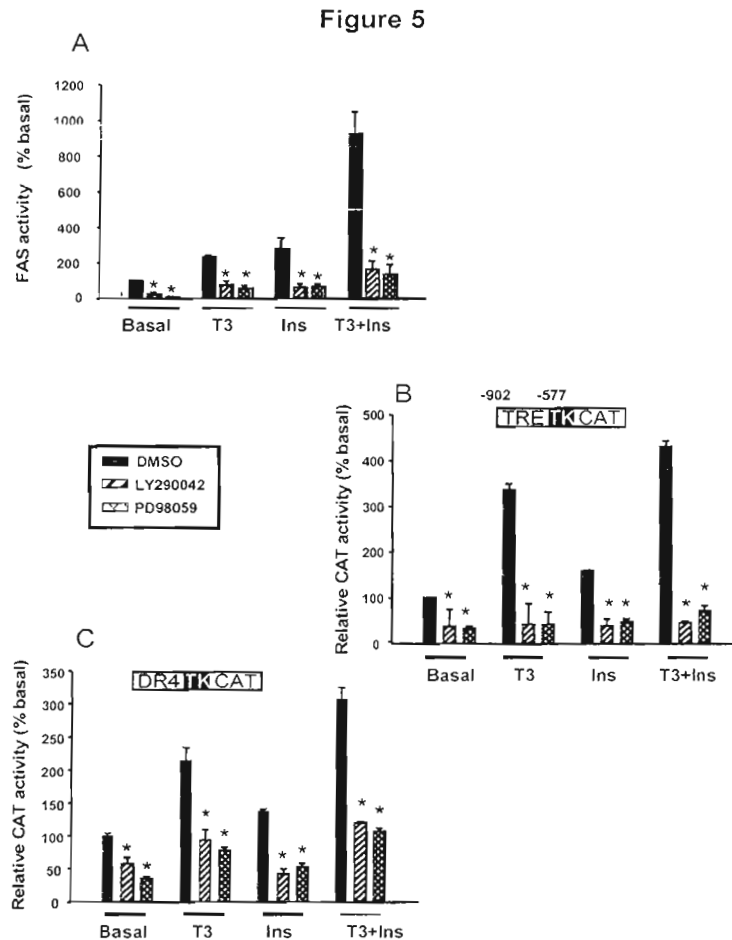
Les résultats de cette section sont inclus dans la figure 5 de l'article: Anne Radenne, Murielle Akpa, Caroline Martel, Sabine Sawadogo, Daniel Mauvoisin. and Catherine Mounier. Hepatic regulation of fatty acid synthase by insulin and T<sub>3</sub>: evidence for T<sub>3</sub> genomic and nongenomic actions. Am J Physiol Endocrinol Metab 295 :884-8894, Aug 5, 2008.

Ma contribution à cet article inclut les activités enzymatiques effectuées avec les inhibiteurs LY 294002 et PD 98059 et l'aide à la rédaction de l'article (Radenne et al., 2008).

### METHODES

*Construction du plasmide* : le promoteur du gène *FAS* nous a été donné par le Dr. A.G. Goodridge (Kameda and Goodridge, 1991). Les premiers 1,6 kb du promoteur de *FAS* ont été cloné dans le vecteur pJFCAT1, qui incorpore le gène rapporteur CAT (Friedman et al., 1999). Le fragment de -902 bp à -577 bp contenant le TRE de *FAS* a été amplifié et inséré dans le vecteur pBLCAT2 en amont du promoteur minimal de la thymidine kinase (TK) (Swierczynski et al., 1991) et du gène rapporteur CAT. La séquence synthétique classique du TRE, DR4 (« direct repeat 4 ») a été également cloné dans pBLCAT2.

*Analyse de l'activité du promoteur* : les cellules HepG2 ont été lysées à la température de la pièce dans 500 µL de tampon « CAT ELISA » (Roche Diagnostics). La concentration protéique (Bradford, 1976) et l'activité β-galactosidase (Sambrook J, 2000) ont été mesurées. L'activité CAT a été évalué par CAT-ELISA d'après les instructions de la compagnie. Les résultats sont exprimés comme activité CAT par mg de protéine soluble et ont été normalisés par l'efficacité de transfection en utilisant l'activité β-galactosidase.



**Figure 5: Effects of LY294002 and PD98059 on FAS activity and TRE-mediated transcription in response to  $T_3$  and insulin treatments (Radenne et al., 2008).** A- CEH were incubated for 24 h without hormones with 1.6  $\mu$ M of  $T_3$ , 100 nM of insulin, or both hormones. 30 min before hormonal stimulations, the cells were pre-incubated with 0.5% DMSO (black bars), 50  $\mu$ M of LY294002 (hatched bars) or 50  $\mu$ M of PD98059 (crossed bars). FAS activities were measured as indicated in the Materials and Methods section. The results are expressed as a percentage of untreated cells (basal) incubated with DMSO, and are the mean of at least 3 independent experiments. The bars indicate the standard deviation (SD). \*  $p < 0.005$  comparing the DMSO condition versus the treatments with the kinase inhibitors. HepG2 cells were transfected with either the TRE-TK-CAT (B) or the DR4-TK-CAT construct (C). The cells were subsequently incubated for another 24 h without hormones (basal), or with 1.6  $\mu$ M of  $T_3$ , 100 nM of insulin, or with both hormones. 30 min before the hormonal stimulations, the cells were pre-incubated with 0.5% DMSO (black bars), with 50  $\mu$ M of LY294002 (hatched bars) or with 50  $\mu$ M of PD98059 (crossed bars). The CAT activities were measured. The results are expressed as a percentage of untreated cells (basal) incubated with DMSO, and are the mean of at least 3 independent experiments. The bars indicate the standard deviation (SD). \*  $p < 0.005$  comparing the DMSO condition versus the treatments with the kinase inhibitors.

Il a été déjà démontré que l'état de phosphorylation des hépatocytes influence l'effet de la  $T_3$  sur la transcription de divers gènes suggérant un effet non-génomique de cette hormone. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de protéines kinases inhibe l'effet stimulateur de la  $T_3$  sur la transcription alors que des inhibiteurs de phosphatase augmenterait cet effet (Radenne, 2007).

Des études antérieures réalisées au laboratoire ont démontré que le  $H_7$ , un inhibiteur général des sérine/thréonine kinases, réduisait de 50% l'activité enzymatique de la FAS dans des hépatocytes stimulés simultanément avec l'insuline et la  $T_3$  ainsi qu'avec l'insuline uniquement et de 40% dans les cellules stimulées à la  $T_3$  seulement (Sawadogo, 2006). Aucune inhibition n'a été enregistrée dans la condition basale (Radenne et al., 2008). Comparativement, en utilisant la génistéine, un inhibiteur général des tyrosines kinases, on n'observe pas d'inhibition significative, que ce soit lors d'une stimulation à l'insuline, la  $T_3$  ou encore lors de la stimulation simultanée (Sawadogo, 2006). Les mêmes effets des inhibiteurs ont été révélés au niveau du promoteur et cela à la fois au niveau de l'IRE que du TRE (Radenne et al., 2008, Moon et al., 2002). Ces données laissent supposer que des voies de signalisation impliquant des sérine/thréonine kinases pourraient avoir un effet sur la régulation de la FAS. La prochaine étape fut donc de tester des inhibiteurs spécifiques de ces sérine/thréonine kinases. En effet, nous avons utilisé LY294002, un inhibiteur de PI3-kinase, et PD98059, un inhibiteur spécifique de MEK1/2, afin de voir leur effet sur l'activité enzymatique de la FAS sous différentes conditions de stimulation. Nous avons alors observé sous toutes les conditions de stimulation, lorsque l'une ou l'autre des voies de signalisation est bloquée par son inhibiteur, une inhibition de l'activité enzymatique, ce qui se retrouve également au niveau de l'activité du promoteur (Radenne et al., 2008). Ces résultats suggèrent que les voies PI3-kinase et Erk1/2 seraient impliquées dans la régulation du gène en réponse à l'insuline et à la  $T_3$  (Radenne et al., 2008).

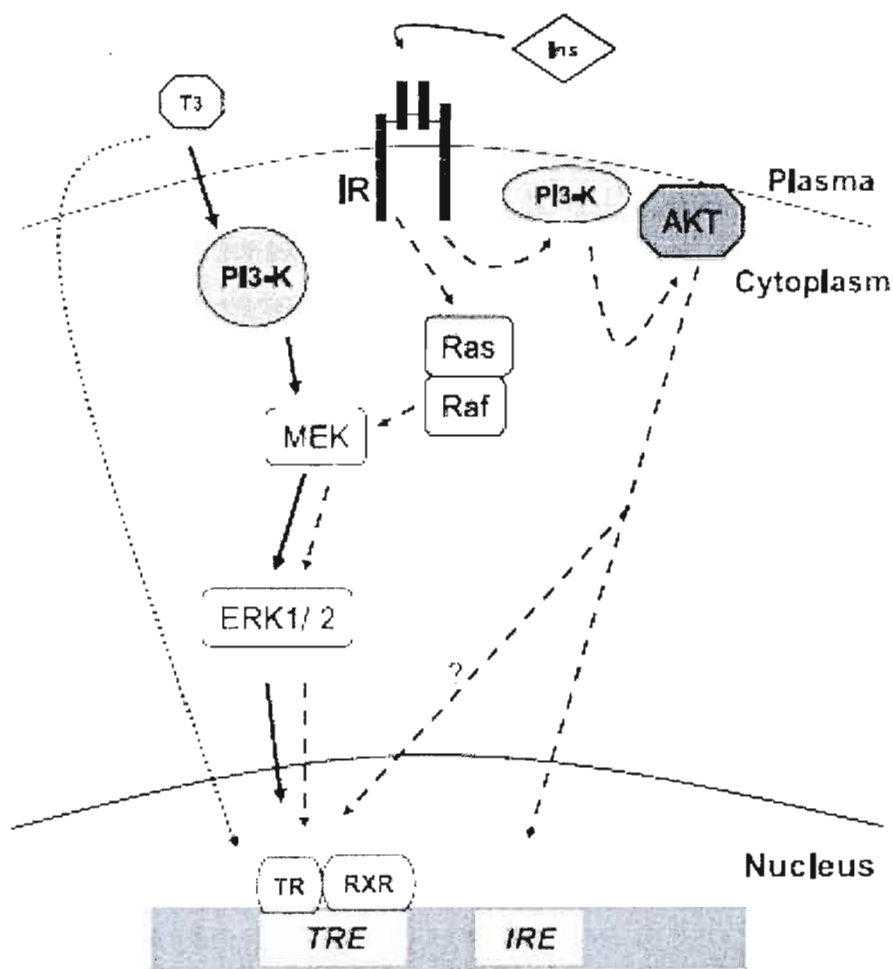


Figure 6 : Représentation schématique de la régulation transcriptionnelle de *FAS* en réponse à la  $T_3$  et à l'insuline (Radenne et al., 2008).

La liaison de l'insuline à son récepteur membranaire mène à l'activation des voies de signalisation **PI3K/Akt** et **MAPK Ras/Raf/ERK1/2**, toutes deux ciblant l'**IRE** et probablement le **TRE** localisé sur le promoteur du gène *FAS*. La  $T_3$  peut réguler la transcription de *FAS* directement par un mécanisme génomique en liant l'hétérodimère **TR/RXR** au niveau du **TRE** (Radenne et al., 2008). Cependant, elle peut également moduler l'activité transcriptionnelle du **TRE** par une action non-génomique, en activant la voie de signalisation dépendante de **PI3K/ERK1/2** (Radenne et al., 2008).

### III. Rôle potentiel de récepteurs membranaires dans le transport des acides gras

SR-BI, un récepteur « scavenger » de classe B qui aurait un rôle dans le transport des acides gras pour les cellules impliquées dans le métabolisme du cholestérol tels les hépatocytes, de manière endogène (Rhainds and Brissette, 1999), ne semble pas être dépendant de l'ATP (Rigotti et al., 2003). Nous avons cependant voulu savoir si ce récepteur jouait un rôle dans l'entrée de l'hexanoate dans la cellule, tel un transport facilité. Pour ce faire, des cellules HepG2, étant un hépato-carcinome humain, sur-exprimant 4.5 fois le niveau endogène de SR-BI (Rhainds et al., 2004) ainsi que des cellules HepG2 sous-exprimant à 70% par rapport au niveau endogène de SR-BI (Rhainds et al., 2003), nous ont été données par le laboratoire du Dre L. Brissette. Elles sont le résultat de la transfection stable d'un fragment de 0.4 kb de la partie 5' de l'ADN complémentaire de SR-BI humain, pour la sous-expression. Ce fragment, contenant le début de la séquence codante récupérée par digestion complète par *EcoRI-XhoI* du vecteur pCEXV-3, a été inséré dans le vecteur d'expression eucaryote pRc/CMV. Les cellules HepG2 à 80% de confluence ont été transfectées avec le vecteur exprimant l'ARN anti-sens ou le vecteur vide par la méthode calcium phosphate classique. Les cellules ont été sélectionnées à la généticine (500µg/mL) pendant 3 à 4 semaines. Les foyers cellulaires ont été isolés et propagés (Rhainds et al., 2003). En ce qui concerne la surexpression, la totalité de l'ADN complémentaire de SR-BI humain (2.5kb) a été récupérée par digestion partielle par *EcoRI* du vecteur pCEXV-3. Ce fragment a été inséré dans un vecteur d'expression eukaryote pZeoSV et l'orientation sens a été vérifiée. Les cellules HepG2 à 80% de confluence ont été transfectées avec le vecteur exprimant SR-BI humain en entier ou le vecteur vide par la méthode calcium phosphate classique. Les cellules ont été sélectionnées à la zeocine (800µg/mL) pendant 3 à 4 semaines. Les foyers cellulaires ont été isolés et propagés (Rhainds et al., 2004). Nous les avons utilisés afin de déterminer si cette classe de récepteur était impliquée dans la captation des MCFA par les hépatocytes.



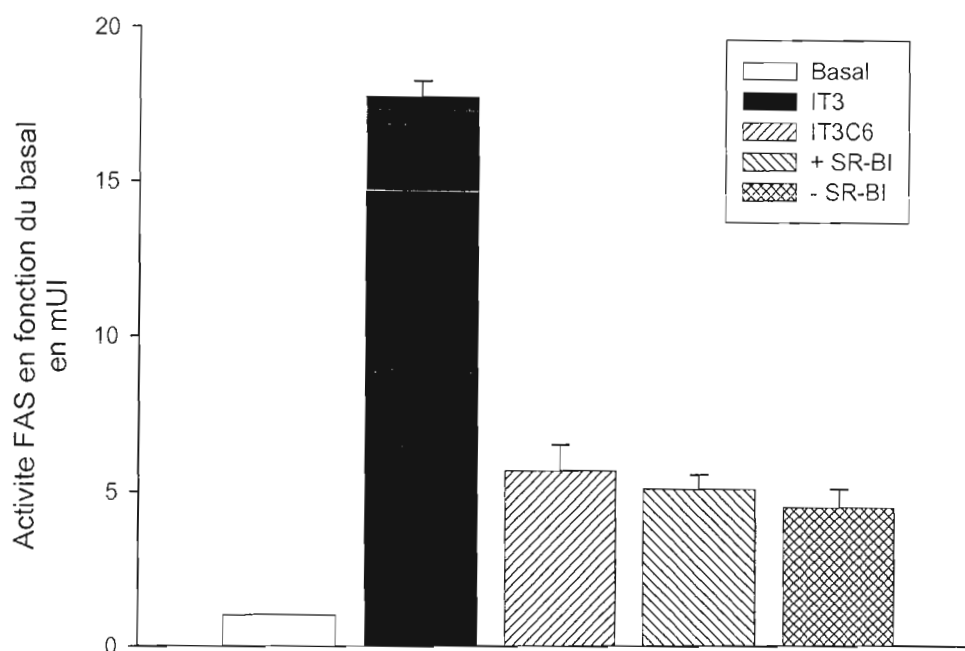


Figure 7: Implication des récepteurs SR-BI dans le transport des MCFA

Dans cette expérience, nous avons mis les différentes cellules HepG2 dans plusieurs conditions de stimulation, telles que le niveau basal (sans aucune stimulation), en présence des deux hormones et enfin en présence des deux hormones et de notre MCFA pour une période de 24 h, afin de voir l'effet que pourrait avoir plus ou moins de récepteurs SR-BI sur l'inhibition induite par C<sub>6</sub> en présence des deux hormones. Nous nous attendions à voir une plus grande inhibition par C<sub>6</sub> de l'activité enzymatique induite par l'insuline et la T<sub>3</sub>, due à la surexpression des récepteurs SR-BI (Rhainds et al., 2004). Cependant, une inhibition plus prononcée lors de la surexpression de SR-BI n'a pas été observée dans aucune des conditions de stimulations décrites dans la figure 7. La sous-expression de SR-BI n'a pas non plus d'effet. Le récepteur SR-BI ne semble donc pas être impliqué dans le transport des MCFA.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, il est important de noter que l'effet inhibiteur des MCFA est très spécifique. Seuls l'hexanoate et l'octanoate sont en mesure de générer cette inhibition, comme on a pu l'observer dans la figure 1 de la section Résultats. En effet, des acides gras à chaîne plus longue ou plus courte n'ont aucun effet sur l'activité enzymatique de la FAS (Roncero and Goodridge, 1992a, Sawadogo, 2006). De plus, cette inhibition n'est observée qu'en présence de  $T_3$  et d'insuline ensemble, comme on peut le constater dans la figure 1 (Roncero and Goodridge, 1992a, Sawadogo, 2006). Il est également important de noter que l'hexanoate semblerait avoir un potentiel inhibiteur plus important que l'octanoate. En effet, comme nous l'avons noté (figure 1 des résultats), les études au laboratoire ont montré que l'inhibition due à l'hexanoate est d'environ 50%, alors que celle due à l'octanoate est de 40% (Sawadogo, 2006, Roncero and Goodridge, 1992a). D'après Roncero et Goodridge (Roncero and Goodridge, 1992a), ce phénomène d'inhibition est spécifique à l'hexanoate et à l'octanoate pour la FAS et l'enzyme malique, car des acides gras à chaînes plus longues ou plus courtes ont été testés et n'exhibent pas cette inhibition.

Nous avons aussi observé que les MCFA pénétraient très rapidement dans la cellule. En effet, nos résultats montrent bien que l'hexanoate est capté par la cellule au bout d'une heure. Il a été montré que l'entrée des MCFA se fait de façon passive (Bach and Babayan, 1982).

Malgré ce qui est déjà connu pour les MCFAs, démontrant un transport passif à travers la membrane, nous avons observé dans des expériences préliminaires un besoin d'ATP au niveau de la membrane lors de l'entrée des acides gras dans la cellule (Sawadogo, 2006), suggérant, entre autres, un transport actif. Afin d'élucider ce phénomène, nous avons émis plusieurs hypothèses et avons procédé à diverses expériences. Tout d'abord, nous avons émis l'hypothèse qu'un récepteur était impliqué dans le transport du MCFA vers l'intérieur de la cellule ce qui permettrait d'expliquer ce besoin en énergie. Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé des hépatocytes (HepG2) dont le niveau d'expression membranaire du récepteur de type « scavenger » (SR-BI) a été modifiée. Nous avons choisi ce récepteur parce qu'il est connu pour sa

présence sur les tissus utilisant beaucoup d'acide gras tels les hépatocytes, qu'il a été impliqué dans le transport des acides gras (Rhainds et al., 2004) et que son expression est augmentée en réponse à l'insuline (Shetty et al., 2006) et la  $T_3$  (Johansson et al., 2005). Nos résultats nous montrent cependant que peu importe le niveau d'expression de SR-BI dans les hépatocytes, l'inhibition de l'activité enzymatique due aux MCFA en présence d'insuline et de  $T_3$  se maintenait. Nous avons donc écarté la thèse de l'entrée dans la cellule par le biais du récepteur SR-BI, suggérant un phénomène de diffusion passive comme il en est fait mention dans la littérature (Bach and Babayan, 1982).

Ayant écarté l'implication de récepteurs, notre deuxième hypothèse, quant au besoin d'ATP observé dans nos cellules, impliquait le processus de transformation des acides gras et probablement une acylation. En effet, la littérature mentionne bien que les acides gras peuvent être acylés dès leur entrée dans la cellule au niveau de la membrane (Bach and Babayan, 1982). Nous avons testé cela en utilisant la Triacsin C, tels que mentionné dans la figure 4 de la section Résultats. La Triacsin C, étant un inhibiteur des acyl-CoA synthases, elle devrait empêcher l'acylation du MCFA au niveau de la membrane. Les résultats de cette expérience nous montrent bien que l'acylation est impliquée dans l'effet des MCFA sur l'activité enzymatique de la FAS. En effet, en présence des deux hormones, insuline et  $T_3$ , la Triacsin C abolit l'effet inhibiteur habituellement observé en présence d'hexanoate. Il s'agit là donc de la première modification que subit le MCFA en entrant dans la cellule. En effet, comme le montre nos expériences utilisant le bromo-hexanoate, ce dernier n'inhibe aucunement l'effet synergique sur l'activité enzymatique de la FAS, induit par l'insuline et la  $T_3$  car il ne peut être acylé. Cela nous amène à la conclusion que le  $C_6$  n'agit pas en tant que tel, mais bien en tant que métabolite qui est tout d'abord transformé sous forme d'acyl-CoA.

Cependant, nous ne savons toujours pas quelle voie métabolique l'acide gras acylé emprunte une fois dans la cellule. En effet, l'utilisation d'acide bétulinique, un inhibiteur spécifique de la diacylglycérol acyl transférase (DGAT), ou d'Etomoxir, un inhibiteur spécifique de la carnitine palmitoyl transférase I (CPT1), n'a aucun effet sur l'inhibition de l'activité enzymatique de la FAS induite par l'hexanoate en présence

des deux hormones, comme on le voit sur la figure 4 de la section Résultats. D'après Bach et Babayan (Bach and Babayan, 1982), les MCFA n'ont pas besoin de carnitine pour pouvoir traverser la membrane mitochondriale. De ce fait, l'inefficacité de l'Etomoxir pourrait très bien être due au fait que les MCFA n'utilisent pas CPT1. Nous ne pouvons donc toujours pas écarter l'hypothèse de la  $\beta$ -oxydation, car il est possible que l'hexanoate passe à travers la membrane mitochondriale afin de se soumettre à la  $\beta$ -oxydation et au cycle de Krebs, pour éventuellement avoir un effet en aval, sur la transcription du gène de la FAS. De plus, les MCFA semblent agir après 30 premières minutes, ce qui est un délai très court. Cela pourrait en effet faire pencher la balance vers l'hypothèse de la  $\beta$ -oxydation, car elle est rapide. Cependant, les résultats obtenus en présence de DGAT semblent indiquer que l'estérification n'est pas la voie empruntée, et que le triglycéride dérivé de l'hexanoate n'est pas le métabolite impliqué dans l'inhibition induite par l'hexanoate en présence d'insuline et de  $T_3$ . Il se pourrait cependant que l'acylation seule soit suffisante. En effet, le métabolite clé pourrait être nul autre que le MCFA acylé.

Nous savons également que la FAS est essentiellement régulée au niveau de la transcription. L'inhibition de la FAS par les MCFA semblerait également se faire à ce niveau dans les 30 premières minutes après l'addition de ces lipides (Sawadogo, 2006). En effet, nous observons que l'inhibition n'est manifeste que lorsque les cellules sont traitées avec les deux hormones et les MCFA, mais pas lorsque ces derniers sont ajoutés au milieu réactionnel pour la quantification de l'activité enzymatique (Sawadogo, 2006). Il serait donc intéressant de découvrir l'identité du métabolite qui agit effectivement au niveau de la transcription et le mécanisme utilisé. Pour ce faire, des essais de transcription en présence des inhibiteurs de voies métaboliques sont actuellement en cours au laboratoire, par transfection des cellules avec une construction du TRE ou DR4. Pour ce faire, notre séquence TRE ou DR4 serait insérée en amont du promoteur minimal thymidine kinase (TK) et d'un gène rapporteur tel le gène de la luciférase ou encore de la CAT (« chloramphenicol acetyl transferase ») (Radenne et al., 2008) et transfectée dans les cellules qui seraient ensuite stimulées avec les hormones insuline et  $T_3$ , les MCFA et les inhibiteurs acide bétulinique, Etomoxir et Triacsin C. Ensuite, effectuer des expériences de retard sur gel (EMSA –

Electrophoretic Mobility Shift Assay) afin de comparer notre MCFA à sa version acylée. Les expériences EMSA, utilisant comme sonde un oligonucléotide radioactif de 20bp à 40bp correspondant au TRE du promoteur du gène FAS et des anticorps anti-TR ou RXR en présence bien entendu du MCFA ou son métabolite, nous permettront de découvrir si l'acide ou l'acyle gras interfère avec la fixation du complexe TR-RXR sur le TRE (Radenne et al., 2008). Les résultats de ces expériences nous permettront de savoir si l'hexanoate a un effet ou non sur la modulation de la fixation des facteurs de transcription.

Les MCFA ou leurs métabolites pourraient agir sur la modulation de la fixation des facteurs de transcription. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait tout d'abord vérifier l'effet du MCFA sur le niveau d'expression d'ARNm de la FAS par RT-PCR (« Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction »). Cela permettrait de savoir si notre agent joue un rôle sur la phosphorylation et l'acétylation du TR. En effet, d'après Thurmond et collègues (Thurmond et al., 1998), les MCFA n'ont d'effet ni sur la fixation de TR sur le TRE, ni sur la liaison entre TR et RXR (Thurmond et al., 1998). Une immuno-précipitation suivie d'un « Western Blot » avec des anticorps reconnaissant des résidus acétylés pourraient nous permettre de vérifier si notre MCFA augmente la densité d'acétylation des histones dans la région du promoteur de la FAS. Cela nous dirait si l'acétylation est impliquée dans le processus qui permet aux MCFA de moduler la transcription du gène de la FAS.

Il serait également intéressant de savoir si les MCFA ou leurs dérivés agissent de concert avec les co-régulateurs du TR qui se fixent au niveau du TRE, tel que CBP/p300 (« CREB binding protein ») et SRC (« steroid receptor coactivator »), qui sont des co-activateurs connus du TR ou NCoR (« Nuclear receptor co-repressor »), SMRT (« Silencing mediator for retinoic acid receptor and TR ») et histone déacétylase 1 (HDAC1), qui sont des corépresseurs (Yen, 2001). Certains de ces corépresseurs ont une activité histone-acétyltransférase, ou déacétylase tandis que d'autres ont une activité de méthylation (Yen, 2001). Il serait intéressant de voir si les MCFA influencent ces différentes activités et par quel mécanisme. Cela pourrait ce faire par « HDAC assay » entre autres. Le « HDAC assay » est une réaction enzymatique en deux étapes. Tout d'abord, les HDAC actives se lient et déacétylent le

substrat, un histone, sur le résidu de lysine. Ensuite, le substrat déacétylé sera reconnu par la trypsine qui libère le 7-amino-4-methylcoumarin associé au substrat. La fluorescence est mesurée et représentative de l'activité HDAC. Si un effet du MCFA est observé sur le recrutement des facteurs de transcription, on pourrait réaliser une analyse de type lipidomique en utilisant les protéines avec lesquelles il agirait comme piège pour l'isolé (« competitive binding assay ») (Shaw et al., 1976). D'autres techniques comme la chromatographie à phase gazeuse (« GC – gas chromatography ») ou encore la spectrométrie de masse (« ESI-MS – electrospray ionisation mass spectrometry ») pourraient éventuellement être des outils utiles pour isoler notre métabolite agissant à son site d'interaction.

Les MCFA pourraient également agir sur la modification post-transcriptionnelle des facteurs de transcription. Les MCFA ou leurs métabolites pourraient, entre autres, moduler la maturation de SREBP-1, ce qui entraînerait l'inhibition de la transcription induite par la  $T_3$  et l'insuline (Zhang et al., 2003). Pour investiguer cette possibilité, une analyse « Western Blot » serait une option afin de déterminer le rôle des facteurs de transcription dans l'acétylation, et notamment celui de SREBP-1c, qui est connu pour avoir un effet sur les réponses à l'insuline. Les MCFA pourraient également agir via leur fixation sur un récepteur de type GPCR (Brown et al., 2005b) et activer différentes voies de signalisation qui moduleraient le niveau de phosphorylation ou d'acétylation du complexe TR/RXR ou des différents co-régulateurs (Yen, 2001). S'il s'avère qu'il y a des modifications post-transcriptionnelles des facteurs de transcription, il serait important d'élucider comment les MCFA ou leurs métabolites agissent au niveau cellulaire. À savoir, comment ils activeraient les acétylases dans le cas de l'acétylation, ou encore quelles voies de signalisation sont affectées par les MCFA. En effet, il a déjà été observé dans notre laboratoire que la voie Akt n'était pas affectée par la  $T_3$  (Radenne et al., 2008), cependant l'inhibition par les MCFA ne se fait qu'en présence d'insuline et de  $T_3$  et elle n'est que de moitié. Il est possible que cette inhibition passe par la voie Akt, qui est affectée par l'insuline. Il serait donc intéressant de voir si c'est le cas et si d'autres voies telle que MAPK (« mitogen-activated protein kinase ») ou encore PI3K

(phosphoinositide 3-kinase) sont également affectée par les MCFA. Cela afin de découvrir comment est gérée l'inhibition de l'effet synergique observé en présence des deux hormones, à des fins thérapeutiques.

En conclusion, si les MCFA nous permettent de moduler l'activité de la FAS sans toutefois l'abolir complètement, ils sont d'excellents candidats comme additifs alimentaires. Ils permettraient de limiter la synthèse de palmitate et de stéarate, qui sont les précurseurs de la synthèse de triglycérides dans le foie. Ces derniers servent au stockage des graisses dans le corps au niveau du tissu adipeux. Cela permettrait donc de lutter contre la prise de poids excessif et donc l'obésité. En tant qu'additifs alimentaires, les MCFA pourraient être ajoutés dans les produits alimentaires tels les yaourts ou encore le lait, d'autant plus qu'ils ont un goût plaisant. Il serait également possible de compléter l'alimentation des animaux d'élevage tels les bœufs afin d'augmenter leurs teneur en MCFA, comme cela se fait déjà pour des additifs tels que la vitamine A, les esters de sucrose d'acides gras, le fer et d'autres acides gras (« Higher fatty acids »). En effet d'autres acides gras sont déjà utilisés comme additifs alimentaires tel l'acide décanoïque.



# **BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

- ABUMRAD, N., HARMON, C. & IBRAHIMI, A. (1998) Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *J Lipid Res*, 39, 2309-18.
- AMY, C. M., WILLIAMS-AHLF, B., NAGGERT, J. & SMITH, S. (1992) Intron-exon organization of the gene for the multifunctional animal fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 1105-8.
- BACH, A. C. & BABAYAN, V. K. (1982) Medium-chain triglycerides: an update. *Am J Clin Nutr*, 950-962.
- BACK, D. W., GOLDMAN, M. J., FISCH, J. E., OCHS, R. S. & GOODRIDGE, A. G. (1986) The fatty acid synthase gene in avian liver. Two mRNAs are expressed and regulated in parallel by feeding, primarily at the level of transcription. *J Biol Chem*, 261, 4190-7.
- BECK, K. F., SCHREGLMANN, R., STATHOPULOS, I., KLEIN, H., HOCH, J. & SCHWEIZER, M. (1992) The fatty acid synthase (FAS) gene and its promoter in *Rattus norvegicus*. *DNA Seq*, 2, 359-86.
- BLACK, P. N. & DIRUSSO, C. C. (2003) Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes, and vectorial esterification. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 454-72, table of contents.
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BROWN, A. J., JUPE, S. & BRISCOE, C. P. (2005a) A family of fatty acid binding receptors. *DNA Cell Biol*, 54-61.
- BROWN, A. J., JUPE, S. & BRISCOE, C. P. (2005b) A family of fatty acid binding receptors. *DNA Cell Biol*, 24, 54-61.
- BROWN, M. S., KOVANEN, P. T. & GOLDSTEIN, J. L. (1981) Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*, 212, 628-35.
- BUTTERWORTH, P. H. W., YANG, P. C., BOCK, R. M. & PORTER, J. W. (1967) The partial dissociation and the reassociation of the pigeon liver fatty acid synthetase complex. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 3508 - 3516.
- CANADA, S. (2006) Obésité. IN CANADA, S. (Ed.) *Votre santé et vous*. Ottawa, Santé Canada.
- CHIRALA, S. S., CHANG, H., MATZUK, M., ABU-ELHEIGA, L., MAO, J., MAHON, K., FINEGOLD, M. & WAKIL, S. J. (2003) Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 6358-63.
- CLARKE, S. D. (1993) Regulation of fatty acid synthase gene expression: an approach for reducing fat accumulation. *J Anim Sci*, 71, 1957-65.
- CLARKE, S. D. & JUMP, D. B. (1994) Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu Rev Nutr*, 14, 83-98.
- DOIRON, B., CUIF, M. H., CHEN, R. & KAHN, A. (1996) Transcriptional glucose signaling through the glucose response element is mediated by the pentose phosphate pathway. *J Biol Chem*, 271, 5321-4.
- E.OPHARDT, C. (2003) la  $\beta$ -oxydation des acides gras.

- FOUFELLE, F., GIRARD, J. & FERRE, P. (1996) Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue: is glucose 6-phosphate the signalling metabolite? *Biochem Soc Trans*, 24, 372-8.
- FRIEDMAN, J. E., ISHIZUKA, T., SHAO, J., HUSTON, L., HIGHMAN, T. & CATALANO, P. (1999) Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes*, 48, 1807-14.
- FUKUDA, N. & ONTKO, J. A. (1984) Interactions between fatty acid synthesis, oxidation, and esterification in the production of triglyceride-rich lipoproteins by the liver. *J Lipid Res*, 25, 831-42.
- GOODRIDGE, A. G. (1973) Regulation of fatty acid synthesis in isolated hepatocytes prepared from the livers of neonatal chicks. *J Biol Chem*, 248, 1924-31.
- GOODRIDGE, A. G. (1986) Regulation of the gene for fatty acid synthase. *Fed Proc*, 45, 2399-405.
- GOODRIDGE, A. G., BACK, D. W., WILSON, S. B. & GOLDMAN, M. J. (1986) Regulation of genes for enzymes involved in fatty acid synthesis. *Ann N Y Acad Sci*, 478, 46-62.
- GREENSPAN, F. S. & GARDNER, D. G. (Eds.) (2001) *Basic and clinical endocrinology*, Lange McGraw-Hill.
- HALL, J. E., GUYTON, A. C. & MIZELLE, H. L. (1990) Role of the renin-angiotensin system in control of sodium excretion and arterial pressure. *Acta Physiol Scand Suppl*, 591, 48-62.
- HILLGARTNER, F. B. & CHARRON, T. (1998) Glucose stimulates transcription of fatty acid synthase and malic enzyme in avian hepatocytes. *Am J Physiol*, 274, E493-501.
- HOLZER, K. P., LIU, W. & HAMMES, G. G. (1989) Molecular cloning and sequencing of chicken liver fatty acid synthase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 4387-91.
- JOHANSSON, L., RUDLING, M., SCANLAN, T. S., LUNDASEN, T., WEBB, P., BAXTER, J., ANGELIN, B. & PARINI, P. (2005) Selective thyroid receptor modulation by GC-1 reduces serum lipids and stimulates steps of reverse cholesterol transport in euthyroid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 10297-302.
- KAMEDA, K. & GOODRIDGE, A. G. (1991) Isolation and partial characterization of the gene for goose fatty acid synthase. *J Biol Chem*, 266, 419-26.
- KATSURADA, A., IRITANI, N., FUKUDA, H., MATSUMURA, Y., NISHIMOTO, N., NOGUCHI, T. & TANAKA, T. (1990) Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of fatty acid synthase in rat liver. *Eur J Biochem*, 190, 427-33.
- LAUX, T. & SCHWEIZER, M. (1990) Dietary-induced pre-translational control of rat fatty acid synthase. *Biochem J*, 266, 793-7.
- LORNITZO, F. A., QURESHI, A. A. & PORTER, J. W. (1975) Subunits of fatty acid synthetase complexes. Enzymatic activities and properties of the half-molecular weight nonidentical subunits of pigeon liver fatty acid synthetase. *J Biol Chem*, 250, 4520-9.
- MANN, G. V. (1974a) The influence of obesity on health (first of two parts). *N Engl J Med*, 291, 178-85.

- MANN, G. V. (1974b) The influence of obesity on health (second of two parts). *N Engl J Med*, 291, 226-32.
- MARSEILLE-TREMBLAY, C. (2006) Impact du profil lipidique maternel sur l'expression de gènes clés de la lipogenèse et du métabolisme du cholestérol dans le placenta humain. *Biochimie*. Montreal, Université du Québec à Montreal (UQAM).
- MCGARRY, J. D. & DOBBINS, R. L. (1999) Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia*, 42, 128-38.
- MOON, Y. S., LATASA, M. J., GRIFFIN, M. J. & SUL, H. S. (2002) Suppression of fatty acid synthase promoter by polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res*, 43, 691-8.
- MOORE, S., KNUDSEN, B., TRUE, L. D., HAWLEY, S., ETZIONI, R., WADE, C., GIFFORD, D., COLEMAN, I. & NELSON, P. S. (2005) Loss of stearoyl-CoA desaturase expression is a frequent event in prostate carcinoma. *Int J Cancer*, 114, 563-71.
- MOUNIER, C. (1994) Clonage et caractérisation de la partie promotrice du gène aviaire de l'Acétyl-CoA Carboxylase. *Laboratoire de Génétique Animale*. Rennes, INRA/ENSAR.
- MOUNIER, C. & POSNER, B. I. (2006) Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can J Physiol Pharmacol*, 84, 713-24.
- MURRAY, K. R., GRANNER, K. D., MAYES, A. P. & RODWELL, V. W. (Eds.) (1995) *Précis de Biochimie de Harper*, Presses de l'Université de Laval.
- NAKAMURA, M. T. & NARA, T. Y. (2004) Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr*, 24, 345-76.
- RADENNE, A. (2007) Etude de la régulation transcriptionnelle du gène de la synthétase des acides gras (FAS) par la triiodothyronine (T3) au niveau hépatique. *Département de Sciences Biologiques*. Montréal, Université du Québec à Montréal.
- RADENNE, A., AKPA, M., MARTEL, C., SAWADOGO, S., MAUVOISIN, D. & MOUNIER, C. (2008) Hepatic regulation of fatty acid synthase by insulin and T3: Evidence for T3 genomic and non-genomic actions. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- RHAINDS, D., BOURGEOIS, P., BOURRET, G., HUARD, K., FALSTRAULT, L. & BRISSETTE, L. (2004) Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells. *J Cell Sci*, 117, 3095-105.
- RHAINDS, D. & BRISSETTE, L. (1999) Low density lipoprotein uptake: holoparticle and cholesteryl ester selective uptake. *Int J Biochem Cell Biol*, 31, 915-31.
- RHAINDS, D., BRODEUR, M., LAPOINTE, J., CHARPENTIER, D., FALSTRAULT, L. & BRISSETTE, L. (2003) The role of human and mouse hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the selective uptake of low-density lipoprotein-cholesteryl esters. *Biochemistry*, 42, 7527-38.
- RIGOTTI, A., MIETTINEN, H. E. & KRIEGER, M. (2003) The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev*, 24, 357-87.
- RONCERO, C. & GOODRIDGE, A. G. (1992a) Hexanoate and octanoate inhibit transcription of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture. *J Biol Chem*, 267, 14918-27.
- RONCERO, C. & GOODRIDGE, A. G. (1992b) Regulation of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture: corticosterone and

- carnitine regulate responsiveness to triiodothyronine. *Arch Biochem Biophys*, 295, 258-67.
- SAMBROOK J, R. D. (Ed.) (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor.
- SAWADOGO, S. (2006) Inhibition de la synthétase des acides gras par les acides gras à chaîne moyenne (MCFA) sur des hépatocytes d'embryon de poulet. *Département de Sciences Biologiques*. Montréal, Université du Québec à Montréal.
- SESSLER, A. M. & NTAMBI, J. M. (1998) Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J Nutr*, 128, 923-6.
- SHAW, W., HUBERT, I. L. & SPIERTO, F. W. (1976) Interference of fatty acids in the competitive protein-binding assay for serum thyroxine. *Clin Chem*, 22, 673-8.
- SHETTY, S., ECKHARDT, E. R., POST, S. R. & VAN DER WESTHUYZEN, D. R. (2006) Phosphatidylinositol-3-kinase regulates scavenger receptor class B type I subcellular localization and selective lipid uptake in hepatocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 2125-31.
- SMITH, S. (2008) Reaction sequence for biosynthesis of fatty acids *de novo* by animal FAS. IN C.H.O.R.I (Ed.).
- STOOPS, J. K., ARSLANIAN, M. J., OH, Y. H., AUNE, K. C., VANAMAN, T. C. & WAKIL, S. J. (1975) Presence of two polypeptide chains comprising fatty acid synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 1940-4.
- STOOPS, J. K. & WAKIL, S. J. (1981a) Animal fatty acid synthetase. A novel arrangement of the beta-ketoacyl synthetase sites comprising domains of the two subunits. *J Biol Chem*, 256, 5128-33.
- STOOPS, J. K. & WAKIL, S. J. (1981b) The yeast fatty acid synthetase. Structure-function relationship and the role of the active cysteine-SH and pantetheine-SH. *J Biol Chem*, 256, 8364-70.
- SUGAWARA, A., YEN, P. M., DARLING, D. S. & CHIN, W. W. (1993) Characterization and tissue expression of multiple triiodothyronine receptor-auxiliary proteins and their relationship to the retinoid X-receptors. *Endocrinology*, 133, 965-71.
- SWIERCZYNSKI, J., MITCHELL, D. A., REINHOLD, D. S., SALATI, L. M., STAPLETON, S. R., KLAUTKY, S. A., STRUVE, A. E. & GOODRIDGE, A. G. (1991) Triiodothyronine-induced accumulations of malic enzyme, fatty acid synthase, acetyl-coenzyme A carboxylase, and their mRNAs are blocked by protein kinase inhibitors. Transcription is the affected step. *J Biol Chem*, 266, 17459-66.
- THURMOND, D. C., BAILLIE, R. A. & GOODRIDGE, A. G. (1998) Regulation of the action of steroid/thyroid hormone receptors by medium-chain fatty acids. *J Biol Chem*, 273, 15373-81.
- TRIGATTI, B. L., KRIEGER, M. & RIGOTTI, A. (2003) Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 1732-8.
- TSUKAMOTO, Y., WONG, H., MATTICK, J. S. & WAKIL, S. J. (1983) The architecture of the animal fatty acid synthetase complex. IV. Mapping of active centers and model for the mechanism of action. *J Biol Chem*, 258, 15312-22.
- WAJCHENBERG, B. L. (2000) Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*, 21, 697-738.

- WHO/OMS (2000) Obesity: Preventing and managing the global epidemic. *WHO Technical Report Series*. 2nd ed. Geneva, World Health Organisation.
- WILLIAMS, R. H. & LARSEN, P. R. (2003) *Williams textbook of endocrinology*, Philadelphia, Saunders.
- WILSON, S. B., BACK, D. W., MORRIS, S. M., JR., SWIERCZYNSKI, J. & GOODRIDGE, A. G. (1986) Hormonal regulation of lipogenic enzymes in chick embryo hepatocytes in culture. Expression of the fatty acid synthase gene is regulated at both translational and pretranslational steps. *J Biol Chem*, 261, 15179-82.
- WITKOWSKI, A., NAGGERT, J., MIKKELSEN, J. & SMITH, S. (1987) Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding the acyl carrier protein and its flanking domains in the mammalian fatty acid synthetase. *Eur J Biochem*, 165, 601-6.
- YEN, P. M. (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*, 81, 1097-142.
- ZHANG, B. B. (2002) Insulin signaling and action: Glucose, lipids, proteins. IN IRA, D. G. & RUSHAKOFF, R. J. (Eds.).
- ZHANG, X. K., WILLS, K. N., GRAUPNER, G., TZUKERMAN, M., HERMANN, T. & PFAHL, M. (1991) Ligand-binding domain of thyroid hormone receptors modulates DNA binding and determines their bifunctional roles. *New Biol*, 3, 169-81.
- ZHANG, Y., YIN, L. & HILLGARTNER, F. B. (2003) SREBP-1 integrates the actions of thyroid hormone, insulin, cAMP, and medium-chain fatty acids on ACC $\alpha$  transcription in hepatocytes. *J Lipid Res*, 44, 356-68.
- ZUBAY, G. (Ed.) (1983) *Biochemistry*, Addison-Wesley.